

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Vegetal**



**Caracterização fenotípica e molecular de isolados de
Campylobacter jejuni e *Campylobacter coli*
de origem avícola**

Manuel Vangajala Soqui

**Tese orientada por: Professor Doutor Rogério Tenreiro
Professor Doutor José Cabrita**

**Doutoramento em Biologia
(Microbiologia)**

2007

Neste trabalho incluem-se resultados das seguintes publicações, artigos submetidos para publicação e comunicações apresentadas em congressos:

Gomes, C., Santos, A., Soqui, M., and Cabrita J. (1996). Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolates in an industrial poultry unit (from production to slaughter) in Portugal. In: Newell, D. (ed.) *Campylobacters, Helicobacters and Related Organisms*. Plenum Press. New York. pp. 301-306.

Soqui, M. V., Tenreiro, T. and Tenreiro, R. Assessment of congruence between biotyping and *gyrA*-PCR for identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*.
Manuscrito em fase final de submissão a *Letters in Applied Microbiology*.

Soqui, M. V., Tenreiro, T., Chaves, S. and Tenreiro, R. Genetic diversity of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* of poultry origin from Angola and Portugal.
Manuscrito em fase final de submissão a *Journal of Applied Microbiology*.

Soqui, M. V., Chaves, S., Cabrita, J. e Tenreiro, R. (2001). Análise taxonómica polifásica em *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*. Trabalho apresentado em painel no Congresso Congresso Nacional de Microbiologia Micro'2001, Póvoa de Varzim, Portugal.

Soqui, M. V. e Tenreiro, R. (2006). Comparação de métodos fenotípicos e moleculares na identificação de estirpes de *Campylobacter jejuni* e *C. coli*. Comunicação oral apresentada nas Jornadas Biológicas, Faculdade de Ciências da Universidade Agostinho Neto, Luanda, Angola.

Para efeitos do disposto no nº 2 do Art. 8º do Decreto-Lei 388/70, o autor da dissertação declara que participou na execução do trabalho experimental descrito, bem como na análise e discussão dos resultados e na redacção dos textos e artigos.

Agradecimentos

A realização do presente trabalho não seria possível sem a disponibilidade de algumas personalidades e Instituições Científicas que contribuíram, dando seu apoio académico, material e moral, pelo que aqui manifestamos os nossos sinceros agradecimentos:

À Professora Doutora **NATÉRCIA RODEIA** do Departamento de Biologia Vegetal (DBV) da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL), pela forma carinhosa como nos acolheu, aceitando ser a madrinha desta etapa da nossa formação. O que nos incentivou bastante, facilitando a nossa integração na Secção de Microbiologia que naquela altura dirigia.

Ao Professor Doutor **JOSÉ CABRITA**, pela iniciativa e coragem que teve por nos ter aceite como seu orientando, sem esquecer os primeiros passos dados com ele neste trabalho.

Ao Professor Doutor **ROGÉRIO TENREIRO**, que além da amizade, incentivo e estímulo, esteve incansavelmente empenhado nos ensinamentos, orientação, sugestões, e conselhos em todas as fases envolvidas nesta pesquisa.

Aos Professores Doutores, **ANA MARIA MOURA PIRES TENREIRO**, **MÁRIO SANTOS**, **LÉLIA CHAMBEL** e **ANA REIS**, todos da Secção de Microbiologia do DBV-FCUL, pelo apoio e amizade manifestados ao longo de todo o tempo que durou o trabalho.

Às Doutoras **SANDRA CHAVES** e **TERESA SEMEDO**, Investigadoras do Instituto de Ciência Aplicada e Tecnologia (ICAT) da FCUL, pelos ensinamentos, sugestões e conselhos formulados durante a fase laboratorial, para que este trabalho se tornasse uma realidade, sem com isso, colocar de parte a nossa amizade.

À Licenciada **TANIA TENREIRO**, Investigadora do Instituto de Ciência Aplicada e Tecnologia (ICAT) da FCUL, pela sua contribuição e inestimável ajuda na análise dos dados obtidos neste trabalho.

Ao **ABDOU LEMSADDEK**, colega de pós-graduação (doutoramento), pela amizade e bom humor à moda africana que o caracterizam e que permitiram uma convivência saudável e sustentável no seio do grupo de trabalho.

À Dr^a. **CESALTINA GOMES**, do Departamento de Bromatologia do Laboratório Nacional de Investigação Veterinária de Lisboa, pelo acolhimento, incentivo e estímulo durante o tempo em que utilizámos aquele laboratório para esta pesquisa.

Ao **INSTITUTO NACIONAL DE BOLSAS DE ESTUDOS (INABE)** de Angola, por ter financiado o projecto, na atribuição de uma bolsa de estudo.

À **FUNDAÇÃO CALOUSTE GULBENKIAN** (Portugal), pelo apoio material e financeiro prestado na realização da primeira parte desta pesquisa.

À **DIRECÇÃO DA FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE AGOSTINHO NETO** que com o apoio de muitos colegas possibilitou os meios financeiros (subsídios de bancada e manutenção de salários), com a finalidade de garantir não só a realização do presente trabalho, mas também e sobretudo a nossa tranquilidade ao longo do estudo.

À **DIRECÇÃO DO INSTITUTO NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA DR RICARDO JORGE** por ter permitido que grande parte deste trabalho se realizasse no seu Laboratório de Microbiologia, particularmente no Sector de *Campylobacter* e *Helicobacter*. Por isso, não podemos deixar de agradecer também a todos os responsáveis e técnicos daquele laboratório.

À Professora Doutora **MARIA AUGUSTA SILVA MARTINS**, Chefe do DEI- Biologia na Faculdade de Ciências da Universidade Agostinho Neto, que funcionou como retaguarda eficaz e segura na procura das soluções (em Angola), nos inúmeros problemas que encontrámos ao longo desta dura caminhada rumo à nossa formação.

À D. **WANDA FRERE** (*In memoriam*), então Directora dos Serviços de Recursos Humanos da Reitoria da Universidade Agostinho Neto, pela amizade, incentivo e conselhos que me impulsionaram a aceitar o desafio de realizar a presente pesquisa.

À **ADELINA**, técnica de Laboratório do Departamento de Microbiologia do Instituto Nacional de Saúde Pública Dr. Ricardo Jorge, que se disponibilizou em apoiar de forma incondicional a preparação de meios e reagentes necessários para a execução das tarefas programadas na primeira fase deste estudo.

Às Senhoras **MÓNICA CAETANO** E **CRISTINA MORGADO**, Recepcionista e Secretária da Administração do ICAT, respectivamente, por todo o serviço administrativo prestado durante o tempo de permanência naquela instituição de investigação da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

Ao meu querido Irmão **Miguel António Ndoloviti** (Rapaz) para cujo apoio, em todos os sentidos, não existem palavras para expressar.

Ao meu pai **MIGUEL NDOLOVITI** (*In memoriam*) e minha Mãe **HELENA LUQUETAMO** por tudo que ambos conseguiram fazer para nos proporcionar uma educação sólida e sustentável, uma eterna gratidão.

À **KATÚ**, pela paciência, persistência, dedicação e amor demonstrados durante o longo período que durou esta formação.

Finalmente, a todos aqueles que nos foram próximos, desde os primeiros momentos até agora que finalizamos, e que de forma directa ou indirecta contribuíram para o desenvolvimento deste projecto de investigação científica.

Numa perspectiva de abordagem polifásica, 187 isolados de *Campylobacter* spp. de origem avícola de Angola e Portugal foram submetidos a uma análise de identificação e tipificação, utilizando métodos fenotípicos e moleculares.

Com a biotipagem identificaram-se 111 isolados de *C. jejuni* (12 de Angola e 99 de Portugal) e 76 de *C. coli* (55 de Angola e 21 de Portugal). A resistência a 7 antibióticos (eritromicina, claritromicina, ampicilina, estreptomicina, oxitetraciclina, ácido nalidíxico e ciprofloxacina) foi avaliada determinando as CMI's das quais resultaram 40 resistotipos entre os 143 isolados analisados, dois deles multi-resistentes.

Na abordagem molecular, foi desenvolvido um método de identificação por *gyrA*-PCR que confirmou 101 isolados de *C. jejuni* e 76 de *C. coli* biotipicamente identificados. Os restantes 10 isolados de *C. jejuni* foram reclassificados como *C. coli*, tendo em conta os resultados obtidos com *gyrA*-PCR.

Utilizando as endonucleases *Sau3A*I e *Hae*III na digestão simples dos ITS e *Eco*RI e *Pst*I na digestão dupla do gene *flaA*, as análises por ITS-ARDRA e RFLP-*flaA* mostraram-se incapazes de identificar estes isolados a nível de espécie. Além disso, o número reduzido de perfis-tipos obtidos revelou um baixo poder de discriminação para estas técnicas.

Na tipificação dos isolados, recorreu-se ainda a análises dos polimorfismos de amplificação obtidos com os "primers" 1281 e 1290 (RAPD), REPI e REPII (Rep-PCR) e csM13 (M13-PCR), estimando-se valores elevados de diversidade entre os isolados de cada espécie com RAPD e Rep-PCR, enquanto que M13-PCR foi o menos diferenciante.

A avaliação da reprodutibilidade, a capacidade de tipificação e o poder discriminante das técnicas de "PCR-fingerprinting" evidenciaram a sua maior aplicabilidade na genotipagem de *Campylobacter* spp.. O uso de uma abordagem polifásica, congregando todas as técnicas de "PCR-fingerprinting", revelou-se como mais eficiente na tipificação e avaliação da diversidade genómica, tendo em conta a fraca estrutura clonal das populações de *Campylobacter* spp. analisadas.

Palavras chaves: *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *gyrA*-PCR, ITS-ARDRA, RFLP-*flaA*, PCR-fingerprinting, biotipagem, resistotipagem, genotipagem, Angola

In a polyphasic approach, 187 *Campylobacter* spp. isolates of poultry origin from Angola and Portugal were identified and typed by phenotypic and genotypic methods.

With the biotyping method, 111 *C. jejuni* (12 from Angola and 99 from Portugal) and 76 *C. coli* (55 from Angola and 21 from Portugal) isolates were identified. The resistance to 7 antibiotics (erythromycin, clarythromycin, ampicillin, streptomycin, tetracycline, nalidixic acid and ciprofloxacin) was evaluated by assessment of CMLs and 40 antibiotypes were found among 143 isolates, two of them multiresistant.

In the molecular approach, a *gyrA*-PCR identification assay was developed and 101 *C. jejuni* and 76 *C. coli* isolates, previously identified by biotyping, were confirmed. The remaining 10 isolates were misidentified as *C. jejuni* and their classification was revised as *C. coli*, based on *gyrA*-PCR.

Using *Sau3AI* and *HaeIII* endonucleases in the single restriction analysis of ITS and *EcoRI* and *PstI* in the double digestion of *flaA* gene fragments, ITS-ARDRA and RFLP-*flaA* analyses were unable to identify these isolates at species level. Furthermore, a reduced number of restriction profiles was obtained, revealing a low discriminatory power for these methods.

In the typing of the isolates, analyses of the amplification polymorphisms obtained with "primers" 1281 and 1290 (RAPD), REPI and REPII (Rep-PCR) and csM13 (M13-PCR), revealed high diversity values within each species both with RAPD and Rep-PCR, while M13-PCR showed to be the least discriminatory.

The evaluation of the reproducibility, the typeability and the discriminatory power of PCR-fingerprinting techniques highlighted their higher applicability for *Campylobacter* spp. genotyping. The use of a polyphasic approach, integrating all PCR-fingerprinting techniques, revealed to be more efficient on typing and assessment of genomic diversity, taking into account the weak clonal structure of the analysed *Campylobacter* spp. populations.

Key words: *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *gyrA*-PCR, ITS-ARDRA, RFLP-*flaA*, PCR-fingerprinting, biotyping, antibiotyping, genotyping, Angola

ÍNDICE

Lista de Figuras	v
Lista de Tabelas	vii
Abreviaturas	ix

PREÂMBULO

1. OBJECTIVOS DO TRABALHO	1
2. ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO	2

PARTE I: INTRODUÇÃO GERAL

1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DO GÉNERO <i>CAMPYLOBACTER</i>	7
2. CONSIDERAÇÕES TAXONÓMICAS SOBRE O GÉNERO <i>CAMPYLOBACTER</i>	11
3. EPIDEMIOLOGIA DA CAMPILOBACTERIOSE	20
3.1. Reservatórios e fontes de contaminação	22
3.1.1. Aves	22
3.1.2. Bovinos	24
3.1.3. Suínos	24
3.1.4. Cães e gatos	24
3.1.5. Leite e água	25
3.1.6. Solos e outros ambientes	26
3.1.7. Outras fontes associadas e implicações da campilobacteriose	27
3.2. Incidência	27
3.3. Patogénese, sintomas, prevenção e tratamento	29
3.3.1. Dose infectante	29
3.3.2. Mecanismos de patogénese	29
3.3.3. Sintomas ou manifestações clínicas	31
3.3.4. Outras complicações clínicas associadas à campilobacteriose	33
3.3.5. Prevenção e tratamento da doença	33

PARTE II: CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DOS ISOLADOS DE *CAMPYLOBACTER*

INTRODUÇÃO GERAL	37
1. Biotipagem	37
2. Resistotipagem	39
3. Serotipagem.....	41
4. Fagotipagem	42
5. Perfis electroforéticos de proteínas celulares.....	43
6. Análise de perfis de ácidos gordos (FAME)	44
 CAPITULO 1: IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS POR BIOTIPAGEM	
1.1. INTRODUÇÃO.....	47
1.1.1. Meios de cultura selectivos.....	47
1.1.2. Identificação e determinação de biótipos	49
1.2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	52
1.2.1. Colheita e tratamento das amostras	52
1.2.2. Isolamento das estirpes	52
1.2.3. Determinação dos biótipos de <i>Campylobacter</i>	52
1. Prova de hidrólise de hipurato	53
2. Prova de produção rápida de ácido sulfídrico	53
3. Prova de hidrólise de DNA.....	54
1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
1.3.1. Prevalência de isolamento das estirpes	54
1.3.2. Espécies e biótipos identificados pelo método de Lior (1984).....	54
 CAPITULO 2: SUSCEPTIBILIDADE DOS ISOLADOS AOS ANTIBIÓTICOS	
2.1. INTRODUÇÃO.....	57
2.1.1. Quinolonas	58
2.1.2. Macrólidos.....	61
2.1.3. Tetraciclinas	63
2.1.4. β -lactâmicos	64
2.1.5. Aminoglicósidos.....	65
2.2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	66
2.2.1. Princípios metodológicos	66
1. Técnica de antibiograma	66
2. Determinação de concentrações mínimas inibitórias	67
2.2.2. Procedimentos técnicos	68
1. Preparação das soluções dos antibióticos	68
2. Inoculação das suspensões de estirpes	68

3. Preparação das diluições dos antibióticos usados	69
4. Série de diluições	69
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
2.4. CONCLUSÕES	88

PARTE III: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS DE *CAMPYLOBACTER*

INTRODUÇÃO GERAL.....	91
------------------------------	-----------

CAPITULO 1: IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS

1.1. INTRODUÇÃO	101
1.2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	104
1.2.1. Extracção de DNA genómico	104
1.2.2. Reacção de amplificação.....	105
1.2.3. Observação dos fragmentos por electroforese em gel de agarose.....	106
1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	106

CAPITULO 2: ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DE RESTRIÇÃO

2.1. ANÁLISE POR ITS-ARDRA

2.1.1. INTRODUÇÃO	109
2.1.2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	111
1. Extracção de DNA	111
2. Reacções de amplificação	113
3. Restrição por endonucleases dos fragmentos amplificados	113
4. Observação dos perfis obtidos por electroforese.....	114
2.1.3. RESULTADOS	114

2.2. ANÁLISE POR RFLP-FLAA

2.2.1. INTRODUÇÃO	120
2.2.2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	124
1. Reacções de amplificação	124
2. Restrição por endonucleases dos fragmentos amplificados	124
3. Observação dos perfis obtidos por electroforese.....	125
2.2.3. RESULTADOS	125

2.3. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO

2.3.1. REPRODUTIBILIDADE DAS TÉCNICAS.....	130
2.3.2. ÍNDICES DE DIVERSIDADE	132

CAPITULO 3. ANÁLISE POR PCR-FINGERPRINTING

3.1. INTRODUÇÃO.....	137
3.1.1. RAPD.....	139
3.1.2. REP-PCR e M13-PCR.....	140
3.2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	143
3.2.1. Reacções de amplificação.....	143
3.2.2. Observação dos perfis por electroforese em gel de agarose.....	144
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	144
3.3.1. Análise dos perfis.....	145
1. Técnica de RAPD.....	145
2. Técnica de REP-PCR.....	150
3. Técnica de M13-PCR.....	152
3.3.2. Avaliação do potencial de diferenciação.....	152
1. Reprodutibilidade das técnicas.....	155
2. Índices de diversidade.....	156
 PARTE IV: ANÁLISE GLOBAL E CONCLUSÕES.....	 161
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 169

Lista de Figuras

PARTE II

FIGURA 2.1: Fluxograma do procedimento experimental seguido na aplicação do método de difusão em agar	71
FIGURA 2.2: Gráfico das frequências das estirpes de <i>Campylobacter</i> spp. isoladas em Portugal	75
FIGURA 2.3: Gráfico das frequências de susceptibilidade das estirpes isoladas em Angola	76

PARTE III

FIGURA 3.1: Exemplificação de perfis electroforéticos obtidos com <i>gyrA</i> -PCR.....	106
FIGURA 3.2: Organização do operão <i>rrn</i> e localização dos sítios de “annealing” para os “primers” utilizados	109
FIGURA 3.3: Perfis de restrição experimentais obtidos a partir dos amplificadores dos ITS de <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>	115
FIGURA 3.4: Perfis obtidos por digestão dupla dos amplificadores do gene da flagelina, utilizando as endonucleases <i>Pst</i> I e <i>Eco</i> RI.....	126
FIGURA 3.5: Representação gráfica dos perfis de restrição “ <i>in silico</i> ” (A a O) e resultados experimentais (PE1A a PE11A) de RFLP- <i>flaA</i>	129
FIGURA 3.6: Equações matemáticas utilizadas na determinação dos índices de diversidade.....	132
FIGURA 3.7: Esquema hipotético da diversificação dos isolados de <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>	134
FIGURA 3.8: Perfis de RAPD de alguns isolados de <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> , utilizando os “primers” 1281 e 1290.....	145
FIGURA 3.9: Dendrograma construído com base nos perfis densitométricos de <i>C. jejuni</i> com o “primer” 1281, utilizando o coeficiente de correlação de Pearson e o método de aglomeração UPGMA	148
FIGURA 3.10: Dendrograma construído com base nos perfis densitométricos de <i>C. coli</i> com o “primer” 1281, utilizando o coeficiente de correlação de Pearson e o método de aglomeração UPGMA	148
FIGURA 3.11: Dendrograma construído com base nos perfis densitométricos de <i>C. jejuni</i> com o “primer” 1290, utilizando o coeficiente de correlação de Pearson e o método de aglomeração UPGMA	149
FIGURA 3.12: Dendrograma construído com base nos perfis densitométricos de <i>C. coli</i> com o “primer” 1290, utilizando o coeficiente de correlação de Pearson e o método de aglomeração UPGMA	149
FIGURA 3.13: Perfis de Rep-PCR de alguns isolados de <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> , utilizando os “primers” REPI/REPII	150

FIGURA 3.14: Dendrograma construído com os perfis de <i>C. jejuni</i> , utilizando os “primers” REPIR e REPIIR, o coeficiente de correlação de Pearson e o método de aglomeração UPGMA	151
FIGURA 3.15: Dendrograma construído com os perfis de <i>C. coli</i> , utilizando os “primers” REPIR e REPIIR, o coeficiente de correlação de Pearson e o método de aglomeração UPGMA	151
FIGURA 3.16: Perfis de M13-PCR de alguns isolados de <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> , utilizando o “primer” M13.....	152
FIGURA 3.17: Dendrograma construído com base nos perfis densitométricos de <i>C. jejuni</i> com o “primer” M13, utilizando o coeficiente de correlação de Pearson e o método de aglomeração UPGMA	153
FIGURA 3.18: Dendrograma construído com base nos perfis densitométricos de <i>C. coli</i> com o “primer” M13, utilizando o coeficiente de correlação de Pearson e o método de aglomeração UPGMA	153
FIGURA 3.19: Dendrograma construído com base nos perfis densitométricos de <i>C. jejuni</i> obtidos numa análise global de “fingerprinting”, utilizando o coeficiente de correlação de Pearson e o método de aglomeração UPGMA	154
FIGURA 3.20: Dendrograma construído com base nos perfis densitométricos de <i>C. coli</i> obtidos numa análise global de “fingerprinting”, utilizando o coeficiente de correlação de Pearson e o método de aglomeração UPGMA	154

Lista de Tabelas

PARTE I:

TABELA 1.1: Apresentação dos grupos de homologia (I,II, III) e suas respectivas espécies	17
--	----

PARTE II:

TABELA 2.1: Sistemas de resistotipos habitualmente usados nas técnicas de biotipagem	40
TABELA 2.2: Alguns meios selectivos utilizados no isolamento de <i>Campylobacter</i> spp.	48
TABELA 2.3: Biótipos de estirpes termófilas enteropatogénicas de <i>Campylobacter</i> spp.....	50
TABELA 2.4: Distribuição dos biótipos de <i>C. jejuni</i> segundo a origem dos isolados.....	55
TABELA 2.5: Distribuição dos biótipos de <i>C. coli</i> segundo a origem dos isolados	56
TABELA 2.6: Algumas datas de autorização de uso de fluoroquinolonas na veterinária em alguns países	60
TABELA 2.7: Valores de concentrações críticas dos antibióticos propostos pelo NCCLS.....	68
TABELA 2.8: Apresentação dos antibióticos usados com os respectivos solventes e diluentes.....	69
TABELA 2.9: Concentrações mínimas inibitórias de alguns antibióticos nas estirpes de referência usadas	70
TABELA 2.10: Concentrações mínimas inibitórias obtidas para as estirpes isoladas em Angola	73
TABELA 2.11: Concentrações mínimas inibitórias obtidas para as estirpes isoladas em Portugal	74
TABELA 2.12: Distribuição das estirpes de origem angolana por concentrações mínimas inibitórias ...	77
TABELA 2.13: Distribuição dos isolados em Portugal por concentrações mínimas inibitórias	78
TABELA 2.14: CMI ₅₀ , CMI ₉₀ e as variações de intervalos das CMIs obtidas com os isolados de Angola e Portugal	79
TABELA 2.15: Resistotipos obtidos com as estirpes de <i>Campylobacter</i> spp. isoladas em Angola.....	81
TABELA 2.16: Resistotipos obtidos com as estirpes de <i>Campylobacter</i> spp. isoladas em Portugal	83
TABELA 2.17: Resistotipos obtidos com as estirpes de Angola e Portugal	84

PARTE III

TABELA 3.1: Primers e suas respectivas sequências e dimensões esperadas do produto de amplificação por <i>gyrA</i> -PCR	104
TABELA 3.2: Mistura de reacção utilizada na amplificação da região génica <i>gyrA</i>	105
TABELA 3.3: Programa de amplificação utilizado na reacção de <i>gyrA</i> -PCR	105
TABELA 3.4: Comparação dos resultados de identificação obtidos com biotipagem e <i>gyrA</i> -PCR	107
TABELA 3.5: Programa de amplificação utilizado na análise das regiões ITS.....	113
TABELA 3.6: Endonucleases utilizadas na digestão dos amplicões das regiões ITS	114

TABELA 3.7: Resultados da análise <i>in silico</i> de sequências ITS de estirpes de referência de <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>	116
TABELA 3.8: Perfis “ <i>in silico</i> ” e padrões experimentais obtidos na amplificação da região ITS.....	117
TABELA 3.9: Padrões “ <i>in silico</i> ” (SH1P-SH6P) e perfis de restrição experimentais (SH1A-SH6A) obtidos com a endonuclease <i>Sau3AI</i>	118
TABELA 3.10: Padrões “ <i>in silico</i> ” (SH1P-SH6P) e perfis de restrição experimentais (SH1A-SH6A) obtidos com a endonuclease <i>HaeIII</i>	118
TABELA 3.11: Distribuição dos isolados de cada espécie pelos perfis de ITS-ARDRA obtidos com as endonucleases <i>Sau3AI</i> e <i>HaeIII</i>	119
TABELA 3.12: Programa de amplificação utilizado na análise do gene da flagelina <i>flaA</i>	124
TABELA 3.13: Endonucleases utilizadas na digestão dos amplicões do gene <i>flaA</i>	125
TABELA 3.14: Resultados da análise <i>in silico</i> de sequências do gene <i>flaA</i> de estirpes de referência de <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>	127
TABELA 3.15: Perfis de restrição “ <i>in silico</i> ” obtidos com as endonucleases <i>PstI</i> e <i>EcoRI</i> na digestão dupla dos amplicões do gene <i>flaA</i>	127
TABELA 3.16: Perfis de restrição experimentais do amplicão <i>flaA</i> obtidos com as endonucleases <i>PstI</i> e <i>EcoRI</i>	128
TABELA 3.17: Distribuição dos isolados de cada espécie pelos perfis de RFLP- <i>flaA</i> obtidos com digestão dupla <i>PstI</i> e <i>EcoRI</i>	129
TABELA 3.18: Valores dos índices de Simpson (D) e Shannon-Wiener (J) estimados na análise das estirpes de <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> por ITS-ARDRA	133
TABELA 3.19: Valores dos índices de Simpson (D) e Shannon-Wiener (J) estimados na análise das estirpes de <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> por RFLP- <i>flaA</i>	133
TABELA 3.20: Mistura de reacção utilizada em RAPD com o “primer” 1281 e com o “primer” 1290...	143
TABELA 3.21: Mistura de reacção utilizada em Rep-PCR com os “primers” REPI/REPII	143
TABELA 3.22: Mistura de reacção utilizada em M13-PCR	144
TABELA 3.23: Programas de amplificação utilizados em RAPD, REP-PCR e M13-PCR.....	144
TABELA 3.24: Valores dos índices de diversidade obtidos em todos os ensaios de “PCR-fingerprinting” em relação a <i>C. jejuni</i>	156
TABELA 3.25: Valores dos índices de diversidade obtidos em todos os ensaios de “PCR-fingerprinting” em relação a <i>C. coli</i>	156

Abreviaturas

ARDRA: Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis
ATCC: American Type Culture Collection
BRENDA: Bacterial Restriction Endonuclease Analysis
DMF: Dimetilformamida
EDTA: Ácido etilenodiaminoacético
FAME: Fatty Acid Methyl Esthers
FDA: Food and Drug Administration
GBS: Síndrome de Guillain-Barré
GDD: Genomic DNA Digest
GES: Guanidina, EDTA e Sarcosil
ISR: Intergenic Sequence Region
ITS: Intergenic Transcribed Spacer
MIC: Minimum Inhibitory Concentration
MIDI: Microbial Identification System
MHA: Müller-Hinton Agar
m-PCR: Multiplex Polymerase Chain Reaction
NA: Ácido nalidíxico
NASBA: Nucleic Acid Sequence-Based Amplification
NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards
NEBCUTTER: New England Biolabs Cutter
PAGE: Polyacrilamide Gel Electrophoresis
PCR: Polymerase Chain Reaction
PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis (Electroforese de campo pulsado)
PLP: Proteínas de ligação à penicilina
R: Resistente
RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA
REA: Restriction Endonuclease Analysis
RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphisms
RFLP-*flaA*: Restriction Fragment Length Polymorphism of flagelin A gene
S: Sensível
TE: Tris-EDTA
TSB: Tryptone Soya Broth

1. OBJECTIVOS DO TRABALHO

Tendo em consideração o papel de *Campylobacter* spp. nas gastroenterites humanas, importa caracterizar, através de vários estudos ou técnicas, as estirpes enteropatogénicas pertencentes a este género.

A presente dissertação teve como objectivo a avaliação da frequência deste agente enteropatogénico em frangos de aviários de Luanda (Municípios de Viana e Samba) e de um matadouro dos arredores de Lisboa (Aveiras), tendo em consideração que os frangos são considerados a fonte mais importante e talvez “primária” das infecções provocadas pelas estirpes de *Campylobacter* spp.

O frango é considerado o maior reservatório de *Campylobacter* e a sua entrada frequente na dieta alimentar da população angolana, em particular a de Luanda e de outros centros urbanos do país, deve torná-lo um dos maiores veículos das gastroenterites que grassam neste e outros países em desenvolvimento onde é apontada como uma das principais causas da mortalidade e morbidade infantis.

Os constantes relatos de casos de emergência e o aumento de resistência das estirpes de *Campylobacter* spp. aos agentes antimicrobianos, tais como os macrólidos (eritromicina) e as fluoroquinolonas (ciprofloxacina, enrofloxacina) geralmente utilizados no tratamento da campilobacteriose, justificam a monitorização dos níveis de resistência em isolados destas espécies. Assim, procedeu-se à avaliação da susceptibilidade dos isolados em estudo a um conjunto de 7 antibióticos, nomeadamente, eritromicina, claritromicina, estreptomicina, ampicilina, ácido nalidíxico, ciprofloxacina e enrofloxacina.

Com o intuito de contribuir não só para o conhecimento dos agentes etiológicos da campilobacteriose que afecta milhares de pessoas no mundo, quer nos países industrializados quer nos que estão em via de desenvolvimento, pretendeu-se caracterizar os isolados de *Campylobacter* spp., provenientes de duas origens diferentes (Angola e Portugal), usando uma abordagem polifásica que englobou métodos fenotípicos, como a biotipagem e a susceptibilidade aos antibióticos de interesse terapêutico, mas que entretanto são muitas vezes usados na veterinária como suplemento alimentar, e por outro, diversos métodos moleculares, mais robustos e fidedignos para identificação e diferenciação dos isolados enteropatogénicos de *Campylobacter*.

Neste trabalho, a utilização das estirpes isoladas em Portugal constituiu um parâmetro de comparação, atendendo às condições menos controladas existentes nos aviários angolanos amostrados.

2. ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

A dissertação encontra-se estruturada em quatro partes. A Parte I corresponde à introdução geral do trabalho e divide-se em 3 pontos principais. No ponto 1 faz-se uma abordagem geral e resenha histórica da taxonomia do grupo que vai desde as primeiras referências sobre o organismo até espécies mais recentemente descritas. A seguir no ponto 2, procurou-se fazer a caracterização geral do género *Campylobacter* enquanto que no último e 3º ponto desta primeira parte faz-se uma abordagem de diversos aspectos referentes à epidemiologia da campilobacteriose.

Em relação à Parte II, procede-se à caracterização fenotípica dos isolados, começando no seu primeiro capítulo a descrever os processos de colheita e tratamento das amostras. A seguir faz-se a identificação dos isolados a nível do género, espécies e biótipos, utilizando o método de biotipagem de Lior (1984). Com os resultados obtidos foi determinada a prevalência dos isolados em relação não só à origem das amostras, mas também em relação a *C. jejuni* e *C. coli*, pois foram as únicas espécies isoladas e identificadas nas amostras em análise neste trabalho.

O capítulo 2 trata da análise da susceptibilidade das estirpes face a sete agentes antimicrobianos, através da determinação de CMI_s (concentrações mínimas inibitórias), sendo alguns destes de uso comum para o tratamento dos humanos no combate à campilobacteriose (eritromicina) e/ou para suplementos alimentares dos animais em Veterinária, em particular nos aviários como é o caso das fluoroquinolonas (ácido nalídixico e ciprofloxacina). Além de uma introdução sobre os antibióticos e os métodos utilizados para testá-los, são apresentados e discutidos os resultados obtidos. O último ponto deste capítulo apresenta algumas conclusões e recomendações que se pensam ser pertinentes.

Com base nos resultados obtidos na caracterização fenotípicas das estirpes, particularmente na biotipagem, foi formulada uma terceira parte (Parte III) dedicada a uma das principais abordagens desta dissertação que é a caracterização molecular dos isolados de *Campylobacter*.

Por isso, foram necessárias algumas técnicas moleculares baseadas em PCR, capazes de gerar 'fingerprints' que permitem a identificação e a tipificação molecular dos isolados. Neste sentido, esta parte do trabalho é tratada em 3 capítulos distintos.

Assim sendo, no capítulo 1 aborda-se a questão da identificação molecular dos 187 isolados de *C. jejuni* e *C. coli* através da técnica de análise por *gyrA*-PCR, tendo como finalidade a confirmação da identificação fenotípica alcançada por biotipagem (Parte II) para os mesmos isolados. Neste capítulo, foram ainda tratadas outras matérias relacionadas com a generalidade do tema em discussão, tais como a extracção e quantificação de DNA dos isolados, a construção de dendrogramas e o tratamento de dados, sendo que pela sua natureza podem ser considerados de âmbito metodológico.

O capítulo 2 da Parte III da dissertação assume a primeira abordagem da diferenciação de isolados baseada na análise de sequências da região genómica ITS (Intergenic Transcribed Spacer) e do gene da flagelina *flaA* dos 187 isolados de *C. jejuni* e *C. coli*, utilizando as técnicas de tipificação por ITS-ARDRA e RFLP-*flaA*, respectivamente. A capacidade de diferenciação destas técnicas avaliou-se comparando os índices de diversidade obtidos para cada uma das espécies em estudo.

No capítulo seguinte da Parte III faz-se uma segunda abordagem da diferenciação dos isolados das espécies em estudo, utilizando algumas técnicas de análise genómica baseadas em 'PCR fingerprinting', nomeadamente RAPD-PCR com os 'primers' 1281 e 1290, Rep-PCR com os 'primers' REPI/ REPII e M13-PCR com o 'primer' csM13. A estrutura deste capítulo obedece ao mesmo esquema dos capítulos anteriormente descritos nesta terceira parte da dissertação, contendo uma breve introdução sobre a matéria em análise e algumas referências sobre os princípios das metodologias relacionadas, o procedimento experimental e finalmente a apresentação e discussão dos resultados obtidos. Com cada uma destas técnicas, foi obtido um 'fingerprinting' que culminou na construção de um dendrograma cuja análise resultou numa abordagem que permitiu a determinação do poder de diferenciação através dos índices de diversidade de Simpson e Shannon-Wiener em cada uma das técnicas em relação a cada espécie em estudo.

No final da dissertação (Parte IV) procede-se a uma análise global dos resultados obtidos com os diferentes métodos usados neste trabalho, realçando o aspecto polifásico e a sua importância na análise de questões relacionadas com a identificação e diferenciação das estirpes de *Campylobacter* spp.

PARTE I

INTRODUÇÃO GERAL

PARTE I: INTRODUÇÃO GERAL

1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DO GÉNERO *CAMPYLOBACTER*

As características que definem os membros do género *Campylobacter* variam de espécie para espécie (Vandamme *et al.*, 2005), pelo que na descrição subsequente apresentam-se aspectos particulares a algumas espécies, em particular as mais relevantes do ponto de vista de saúde pública.

As dimensões das células nas estirpes de *Campylobacter*, são aproximadamente semelhantes, e os seus valores médios podem variar entre 0.5 e 8.0 μm e entre 0.2 e 0.8 μm de comprimento e diâmetro, respectivamente. Esta característica tornou-se importante na medida em que permite o isolamento destas bactérias através da técnica de filtração que retém as bactérias contaminantes da flora fecal.

As bactérias do género *Campylobacter* têm o padrão estrutural típico de parede celular das bactérias Gram negativas. A sua membrana celular externa é constituída por uma dupla camada que se instala livremente sobre a parede celular (Ritchie, *et al.*, 1966).

O género *Campylobacter* é constituído por bactérias Gram negativas, não formadoras de endósporos e que são geralmente encontradas em formas de bastonetes caracteristicamente espirilados ou encurvados em vírgula. Essas bactérias podem ainda apresentar uma citomorfologia particularmente parecida com a letra **S** ou de asas de gaivotas, quando as células são agrupadas em cadeias curtas de apenas duas células (Vandamme *et al.*, 1991). Entretanto, numa única célula pode observar-se uma curva ou torção que dá a estas bactérias a morfologia vibrióide.

Os microrganismos deste grupo bacteriano apresentam um único flagelo polar numa ou em ambas as suas extremidades celulares pontiagudas. Este flagelo permite a sua deslocação, imprimindo movimentos de ziguezague e é cerca de duas ou três vezes maior que a própria célula que o contém (Smibert, 1978).

O crescimento destas bactérias requer condições especiais que vão desde a composição dos meios de cultura (meios selectivos), até às condições de incubação, pois sendo microaerófilas, só podem tolerar concentrações mínimas de oxigénio que se situam entre os 5 e 10%, para algumas e entre 3 e 15% para outras.

Embora uma concentração de oxigénio relativamente elevada no meio de cultura possa permitir o crescimento de algumas estirpes de *Campylobacter* spp., uma concentração de 21% é contudo considerada prejudicial para o crescimento destas bactérias.

No entanto, as concentrações de dióxido de carbono podem ficar entre 3 e 5% enquanto que as concentrações em azoto podem atingir 85% para o crescimento óptimo dessas bactérias.

As condições atmosféricas ideais para a incubação destas bactérias podem ser obtidas com a utilização de sistemas geradores de gás (e.g. Gas-pack, Oxoid), que proporcionam uma concentração de 5-6% de oxigénio e 10% de dióxido de carbono em jarras de anaerobiose (Wang *et al.*, 1982), ou como foi proposto por Karmali & Fleming (1979), pode ser utilizada uma mistura de 5% de dióxido de carbono e 95% de azoto em substituição de dois terços do ar de câmaras herméticas.

Em condições ambientais de humidade relativa máxima, verifica-se também que a utilização de dióxido de carbono, numa concentração de 10% permite que estirpes de *C. coli* e *C. jejuni* possam tolerar o oxigénio a uma concentração de 18%. Estas condições apresentam a mesma eficácia que as da microaerofilia que geralmente se utilizam em vários laboratórios (Fraser *et al.*, 1992).

Em condições de aerobiose menos severas, a adição de fumarato e/ou de formato ao meio de cultura favorece o crescimento de certas estirpes deste género, observando-se ainda que a presença de 7% de hidrogénio permite o crescimento de estirpes de *C. jejuni*.

Nas condições de incubação desfavoráveis, podem ser observadas culturas com células em formas cocóides. Estas células não têm capacidade de multiplicação e são consideradas não viáveis. Elas são caracterizadas pela perda das suas propriedades físico-químicas e fisiológicas, tornando-se conseqüentemente degenerativas.

Nas bactérias do género *Campylobacter*, esta situação é provocada pela existência de condições adversas tais como a presença de elevadas concentrações de oxigénio molecular (O₂) ou de derivados tóxicos tais como peróxido de hidrogénio, radicais hidroxilo e aniões superóxido. Estas substâncias são resultantes das actividades metabólicas das células por mecanismos de auto-oxidação lipídica e oxidação fotoquímica, não tendo estas bactérias mecanismos de resistência ou de eliminação dessas substâncias (Moran & Upton, 1987).

Nestas circunstâncias as células destes organismos transformam-se rapidamente em corpos esféricos, vulgarmente designadas por formas cocóides. Na verdade, uma concentração mínima de apenas 0.00124% de peróxido de hidrogénio é suficiente para inibir o crescimento destas bactérias.

As formas cocóides podem ainda ser originadas por envelhecimento das células após um período de incubação mais longo que o recomendado. Este processo de envelhecimento da cultura pode começar após 24 horas a 42°C ou após um período de 48 horas para uma temperatura de 37°C.

Por essa razão, e com objectivo de atenuar os efeitos tóxicos dos derivados de oxigénio, alguns compostos com uma capacidade redutora são adicionados aos meios de cultura. Assim, são usados aditivos como o piruvato de sódio, o metabissulfito de sódio e o sulfato de sódio, por um lado (Hoffman *et al.*, 1979; George *et al.*, 1978), e o sangue, que contém enzimas como a superóxido dismutase, peroxidase e catalase, que tendo uma acção neutralizante dos efeitos tóxicos de derivados de oxigénio aumentam a aerotolerância destas bactérias (Bolton *et al.*, 1984).

As bactérias do género *Campylobacter* são capazes de crescer a temperaturas de 35-37°C, mas não crescem geralmente a 4°C. Para as bactérias pertencentes às espécies *C. jejuni* e *C. coli* a temperatura óptima é de 42-43°C, sendo as temperaturas mínimas e máxima avaliadas em 30 e 47°C, respectivamente. Estas espécies, juntamente com *C. lari* e *C. upsaliensis*, formam o grupo dos campilobacteres termofílicos, estão frequentemente associadas a gastroenterites humanas e são transportadas no tracto intestinal de uma variedade de animais (Vandamme *et al.*, 2005).

Os campilobacteres termofílicos nunca crescem a temperaturas abaixo de 30°C enquanto que as estirpes da espécie *C. fetus*, incluídas no grupo dos mesófilos, só crescem a 25°C mas nunca a 43°C. Segundo Blaser *et al.*, (1980), *C. jejuni* apresenta melhor capacidade de sobrevivência nas temperaturas mais baixas (próximas de 4°C).

Num estudo realizado por Korhonen and Martikainen (1991), foi avaliada e comparada, pelo método de contagem de células viáveis, a sobrevivência a 4 e 20°C de estirpes de *C. jejuni* e *C. coli* isoladas de suínos e gado.

O estudo revelou que *C. jejuni* sobrevivia muito mais tempo que *C. coli* em água não tratada ou filtrada por membrana. Isto pode explicar, segundo os autores, o porquê das estirpes de *C. jejuni* serem mais frequentemente isoladas das águas de superfície que as de *C. coli*.

Os resultados deste trabalho confirmaram as conclusões de outros estudos nos quais já havia sido argumentado que as ambas espécies sobreviviam melhor nas águas filtradas e que a sua sobrevivência é afectada pelo consumo das substâncias nutritivas nas águas não tratadas, assim como pela competição pelas mesmas (Pokorny, 1989).

E, por se registarem mais isolamentos de *C. jejuni* que *C. coli* nas águas de superfícies, muitos autores têm sugerido a possibilidade de haver diferenças na sobrevivência entre diferentes espécies do género *Campylobacter*. O que pode estar ligado com as diferenças na fisiologia e/ou predação destes microrganismos (Bolton *et al.*, 1987a; Carter *et al.*, 1987; Rosef *et al.*, 1987).

Um dos grandes problemas com que se debatem os investigadores na indústria alimentar é a diferença que se verifica entre as temperaturas de crescimento das bactérias deste grupo no laboratório e as do seu crescimento e/ou de sobrevivência nos alimentos e no ambiente.

Partindo do princípio de que a sobrevivência de *Campylobacter* em alimentos depende das propriedades físico-químicas e das condições de conservação dos mesmos, é também de extrema importância considerar o tempo que estas bactérias podem sobreviver à temperatura ambiente, pois como se sabe, uma quantidade bastante reduzida de microrganismos é suficiente para causar a doença (Robinson, 1981).

A temperatura influencia a humidade do meio. As estirpes de *Campylobacter* são sensíveis à desidratação. A sensibilidade destas bactérias à desidratação depende muito do nível de actividade da água no meio, e este é fundamental para a sua sobrevivência. O seu crescimento só é permitido a uma determinada gama de actividade da água (Lowrie *et al.*, 1974). Por isso, sendo as estirpes de *Campylobacter* sensíveis à actividade de água, é de prever um melhor crescimento em meio húmido do que em ambiente seco. Isto explica o facto de se isolar mais facilmente estas bactérias de carne fresca do que de carne seca (Hudson & Roberts, 1982).

Estudos existentes revelam que *Campylobacter jejuni* é também sensível ao pH do meio. Em conjugação com a sua temperatura óptima de crescimento (42°C), estas bactérias termófilas crescem melhor a valores de pH entre 5,5 e 7,5 (Doyle & Roman, 1981).

No entanto, à medida que a temperatura baixa, em condições de pH inferiores às óptimas para o crescimento, torna-se difícil a sobrevivência das estirpes de *Campylobacter*. Portanto, estas bactérias não crescem em condições de pH ácido (Doyle & Roman, 1981).

As bactérias do género *Campylobacter* são organismos quimiorganotróficos com um metabolismo do tipo respiratório em que o oxigénio é geralmente o aceitador terminal de electrões. Algumas espécies deste género podem usar outros aceptadores de electrões como nitrato, fumarato, aspartato e óxido de trimetilamina para o seu crescimento em anaerobiose. De facto, esta propriedade tem sido usada como critério de diferenciação entre espécies de *Campylobacter* (Razi *et al.*, 1980).

Além de não fermentarem nem oxidarem os hidratos de carbono, estas bactérias não têm compostos ácidos nem neutros como produtos finais. Quanto à energia requerida para os processos metabólicos, esta é proveniente da oxidação dos ácidos orgânicos intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, nomeadamente fumarato, succinato, malato, lactato, piruvato e α -cetoglutarato, e da desaminação e oxidação dos ácidos glutâmico e aspártico (Elharrif & Megraud, 1986).

Para estas bactérias, não há registos da existência de actividade lipásica, nem da capacidade de hidrolizar a ureia e a gelatina, enquanto que podem reagir negativamente nas provas bioquímicas de vermelho de metilo e Voges Proskauer. A presença de oxidase é comum a todas as espécies, excepto *C. gracilis* e isolados esporádicos de *C. concisus* e *C. showae*. A maioria das espécies não produz pigmentos, exceptuando *C. hyointestinalis* e *C. mucosalis*, cujas colónias em meio de cultura apresentam uma pigmentação amarela.

2. CONSIDERAÇÕES TAXONÓMICAS SOBRE O GÉNERO *CAMPYLOBACTER*

Os primeiros microrganismos do género *Campylobacter* foram observados em 1913, sendo considerados como provável causa de abortos verificados em ovelhas (McFadyean & Stockman, 1913). Na altura tudo apontava que estes microrganismos pertencessem ao género *Vibrio* devido à semelhança de características morfológicas. Estes organismos microscópicos de forma bacilar que, em 1919, Theobald-Smith & Taylor consideraram também responsáveis pelo aborto no gato, receberam a denominação de *Vibrio fetus*.

A estes dois casos juntou-se o de disenteria invernosa em bezerros, infecção à qual foi associado um agente bacteriano com as características acima referenciadas e que Jones *et al.* (1932), por sua vez chamaram de *Vibrio jejuni*. Outros agentes bacterianos deste grupo antes descritos por Prevôt (1940) foram associados a disenteria em suínos por Doyle (1944) denominando-os *Vibrio coli*.

Se até aqui era reconhecido o papel patogénico destes organismos nos animais, é verdade que se antevia um longo caminho a percorrer para que bactérias pertencentes a este grupo fossem associadas as infecções nos humanos. E tudo começou quando Levy (1946) observou microscopicamente estes organismos espiralados no sangue de algumas pessoas, entre as quais 350 apresentavam uma infecção gastrointestinal, mas sem no entanto se ter conseguido a cultura destes organismos a partir do sangue.

O seu isolamento foi possibilitado um ano mais tarde por Vinzent *et al.* (1947) que pesquisaram o organismo no sangue de três mulheres grávidas, duas das quais vítimas de abortos espontâneos.

Em 1953, Florent isolou do sémen e do tracto vaginal de bovinos outras formas vibríóides cujas características bioquímicas se diferenciavam das de *V. fetus*, tendo Thouvenot & Florent (1954) considerado estes microrganismos como *Vibrio bubulus*.

Se o trabalho de Vinzent e colaboradores marcou o primeiro passo na associação destes organismos à patologia humana, o acontecimento mais importante foi protagonizado por King (1957) que conseguiu a proeza de isolar, a partir do sangue de um doente, um microrganismo morfológicamente semelhante aos vibrios isolados por aqueles autores.

Mas este microrganismo era bioquímica e antígenicamente diferente, tendo uma capacidade de crescimento a 42°C. Daí surgiu a denominação de "Vibrio related". Mas, apesar da descoberta desta nova relação patogénica entre o Homem e estes novos vibrios, foi preciso esperar pelo início da década de setenta para o conhecimento mais profundo desta relação.

Como se pode depreender do que acima foi exposto, a caracterização taxonómica deste grupo teve sempre os seus critérios-base relacionados com as características patológicas ou melhor com as relações patológicas deste com os tecidos ou regiões, ou ainda órgãos dos seus hospedeiros que na altura da sua primeira observação ou isolamento se restringiam a alguns animais como suínos, ovelhas, etc. E, características como as formas bacilares espiraladas e/ou encurvadas determinaram e justificaram desde o início da sua descoberta a posição taxonómica que o incluiu, durante muitos anos, no género *Vibrio*.

A falta de sensibilidade deste grupo de bactérias à maioria das provas bioquímicas geralmente usadas para a identificação das bactérias, particularmente a não catabolização dos açúcares (carboidratos), dificultou, ao longo dos anos a sua identificação e, por conseguinte, a sua classificação.

Sebald & Véron (1963), utilizando algumas provas bioquímicas como a hidrólise de hipurato e de DNA, a produção do ácido sulfídrico e a composição de DNA distinguiram os organismos já denominados *V. fetus*, *V. jejuni* e *V. coli* das tradicionais bactérias do género *Vibrio*.

O estudo permitiu detectar o baixo grau de afinidade taxonómica existente entre estes dois grupos bacterianos levando os autores a excluir as 3 espécies acima referenciadas do género *Vibrio* no qual haviam sido colocadas ao longo de todos estes anos.

Desta maneira, o trabalho contribuiu muito para a decisão de se criar um novo género que os mesmos investigadores designaram por *Campylobacter* e que viria a englobar as 3 espécies que passaram a denominar-se *Campylobacter fetus*, *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*.

No entanto, é importante destacar ainda o trabalho de Dekeyser *et al.*, (1972) ao longo do qual estes autores conseguiram recuperar estirpes de *Campylobacter* das fezes de doentes humanos com diarreia.

Véron & Chatelain (1973) propuseram ainda, após um estudo taxonómico mais detalhado dos organismos em questão e com base nas características fenotípicas, a estruturação taxonómica de *Campylobacter fetus* em duas subespécies, *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* e *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*, para estirpes que além de serem catalase-positivas e H₂S-negativas são responsáveis por abortos e infertilidade infecciosa em vacas e ovelhas, respectivamente.

Numa proposta feita pelos mesmos autores, as estirpes descritas por Florent (1953) foram divididas em duas subespécies pertencentes à espécie *Campylobacter sputorum*, sendo respectivamente, *Campylobacter sputorum* subsp. *sputorum* e *Campylobacter sputorum* subsp. *bubulus*, ambas caracterizadas por apresentar um resultado negativo na reacção de catalase.

Neste mesmo trabalho, os autores mantiveram inalteradas as estruturas taxonómicas já existentes para as estirpes pertencentes às espécies *C. jejuni* e *C. coli*, bactérias consideradas termófilas, produtoras de catalase e de ácido sulfídrico.

Na 8ª edição do Manual de Bergey de Bacteriologia Determinativa, o novo género formado foi aliado ao género *Spirillum* constituindo uma nova família, Spirillaceae (Smibert, 1974). Mas esta ideia foi alguns anos mais tarde abandonada devido à ausência de esclarecimentos sobre as relações filogenéticas entre os organismos destes dois géneros.

Utilizando os ácidos gordos celulares na caracterização das espécies de *Campylobacter*, verificou-se que estirpes de *Campylobacter mucosalis*, isoladas pela primeira vez por Tanner *et al.*, (1981), diferenciavam-se das outras espécies por apresentarem ácido láurico (Moss *et al.*, 1983) e constatando-se por outro lado que as espécies *C. coli* e *C. jejuni* eram as únicas espécies com ácido ciclopropânico.

Mas, apesar da capacidade de diferenciação entre estas espécies de *Campylobacter*, esta técnica não apresenta a capacidade de discriminação ideal para as estirpes de *Campylobacter*, sendo deste modo considerada muito limitada, pelo que não é utilizada na classificação das bactérias deste género.

Benjamim *et al.* (1983), descreveram um grupo de bactérias que se diferenciam das outras bactérias termofílicas pertencentes ao género *Campylobacter* pela sua capacidade de resistência ao ácido naldíxico. A designação *Campylobacter laridis*, para estes microrganismos, deriva do facto dos representantes desta espécie serem frequentemente isolados de gaivotas (*Larus* = género de gaivotas). Posteriormente, von Graevenitz (1990) procedeu à correcção ortográfica da denominação da espécie *C. laridis*, que passou a ser chamada *Campylobacter lari*.

Na altura do aparecimento da 1ª edição do "Manual de Bergey's de Sistemática Bacteriana (1984), os seus autores rejeitaram a ideia de que *Campylobacter* e *Spirillum* deviam pertencer à mesma família. Pesou na decisão o facto de se ter constatado um baixo grau de afinidade taxonómica entre ambos os géneros.

No entanto, nesta edição as estirpes do género *Campylobacter* foram repartidas nas seguintes 5 espécies e respectivas subespécies: *C. fetus*, subdividida em *C. fetus* subsp. *fetus* e *C. fetus* subsp. *venerealis*; *C. sputorum*, com *C. sputorum* subsp. *sputorum*, *C. sputorum* subsp. *mucosalis* e *C. sputorum* subsp. *bubulus*; *C. jejuni*; *C. coli* e *C. concisus*.

Portanto, ficou demonstrado que, apesar das espécies *C. jejuni*, *C. coli*, *C. sputorum*, *C. fetus* e *C. concisus*, pertencentes ao género *Campylobacter* e os membros do género *Spirillum* apresentarem características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas comuns, ambos constituíam dois géneros distintos.

Incentivados pelos resultados alcançados nos estudos anteriores, e que despertaram interesse para o estudo destas bactérias, vários investigadores propuseram-se a trabalhar afincadamente na observação e determinação das condições de crescimento (meios de cultura, temperaturas óptimas de crescimento, etc.), o que lhes permitiu ao longo dos anos que se seguiram a descrição de muitas outras espécies do grupo em vários outros nichos ecológicos como alimentos (leite, carne, etc.), água e solo.

A partir daí foram isoladas e descritas muitas espécies, algumas das quais inicialmente identificadas como pertencentes ao género *Campylobacter* mas que com a evolução taxonómica do grupo, quer a nível supra quer infra-específico, foram em alguns dos casos, após sucessivas reavaliações e reestruturações taxonómicas dos grupos, enquadradas noutros géneros, espécies ou subespécies.

As bactérias da espécie *Campylobacter hyointestinalis* (Gebhart *et al.*, 1983), isoladas e relatadas pela primeira vez em suínos como agente etiológico das doenças entéricas, começaram também a ser isoladas em carneiros e outros animais (Gebhart *et al.*, 1985), assim como nos humanos com patologia entérica (Ursing *et al.*; 1984; Edmonds *et al.*, 1987).

No entanto, Hill *et al.* (1987) e Harrington & On (1999), em estudos baseados na determinação de homologias de sequências de rRNA 16S, confirmaram a existência de duas subespécies: *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, relacionada com a gastroenterite nos suínos, e *C. hyointestinalis* subsp. *lawsonii*, isolada do estômago de suínos.

Entretanto, Marshall e Warren (1984) isolaram da mucosa gástrica de pessoas com quadro clínico de úlceras pépticas e de gastrites, bactérias que denominaram por *Campylobacter pyloridis*. Posteriormente, Marshall & Goodwin (1987) propuseram a alteração do nome desta espécie para *Campylobacter pylori*.

Outras bactérias, isoladas de estômagos de furões por Fox *et al.* (1986), apresentavam não só semelhança fenotípica, como também maior semelhança genética por estudos de hibridação DNA-DNA, com o então designado *C. pylori*, pelo que foram consideradas uma subespécie daquela espécie, ou seja *Campylobacter pylori* subsp. *mustelae* (Fox *et al.*, 1988). Posteriormente verificou-se que os resultados originais de hibridação DNA-DNA estavam errados e foi proposta uma nova espécie para estas estirpes isoladas de furões: *Campylobacter mustelae* (Fox *et al.*, 1989).

No entanto, com base nos conhecimentos taxonómicos sobre estas bactérias, particularmente no que toca a afinidade das estirpes deste grupo com as das outras espécies, e por se ter observado pouca semelhança genética entre os membros deste grupo com os das restantes espécies até então isoladas e identificadas como *Campylobacter*, Romaniuk *et al.* (1987) já tinham sugeriram a não inclusão de *C. pylori* no género *Campylobacter*. Goodwin *et al.* (1989), após estudos de sequenciação de rRNAs 5S e 16S, demonstraram haver uma correlação entre os resultados obtidos neste estudo e os dos realizados por seus antecessores. Estes autores, utilizando os resultados das análises fenotípicas e genómicas das estirpes deste grupo propuseram a criação de um novo género, que foi denominado *Helicobacter*, integrando as espécies *Helicobacter pylori* e *Helicobacter mustelae*.

Das gengivas dos humanos com periodontose foram isoladas estirpes com características bioquímicas idênticas a *C. mucosalis* (Lawson *et al.*, 1981; Roop *et al.*, 1985b). Mas, pelo facto de se diferenciarem geneticamente deste último, foram incluídas numa nova espécie denominada *Campylobacter concisus* (Tanner *et al.*, 1981). Estes microrganismos foram também encontrados em sangue e fezes dos humanos (Vandamme *et al.*, 1989).

Bactérias com capacidade de fixar o azoto foram isoladas a partir das raízes de uma planta da espécie *Spartina alterniflora*, na Nova Escócia, Canadá (Mc Lung & Patriquim, 1980; Neill *et al.*, 1985b). Esta espécie bacteriana foi identificada com características morfológicas e bioquímicas, assim como proporções do teor de G+C próximas da maioria das espécies do género *Campylobacter*, tendo sido inicialmente designada por *Campylobacter nitrofigilis*.

São bactérias obrigatoriamente microaerófilas, possuindo nitrogenase que permite a fixação do azoto. Daí o seu nome, e é geralmente encontrada em associação com as raízes da planta referida demonstrando também a capacidade de crescer em meios de cultura com 5 a 7% de sais (McLung *et al.*, 1983).

Microrganismos idênticos foram também isolados dos sedimentos associados a raízes da espécie acima referida na região de Sapelo (Irlanda), e todas as estirpes provenientes desta localidade apresentaram células com um único flagelo polar, em forma de bastonetes, encurvadas, delgadas, rígidas, cujas dimensões observadas foram de 0,2 a 0,9 µm de largura e de 1 a 3 µm de comprimento e com resultado negativo para a reacção de Gram.

Nas provas bioquímicas tais como as da nitrogenase, catalase, oxidase, produção de ácido sulfídrico a partir de cisteína, assim como a produção de pigmentos a partir de triptofano, todas as estirpes deste grupo deram resultados positivos (McLung, *et al.*, 1983).

O seu teor em G + C foi reavaliado e fixado entre 27,9 e 28,8 mol.%, sendo menor que o das espécies de *Campylobacter* com prova de catalase positiva e cujo teor em G+C se situa entre os 29,5 e 36 mol.% (Sebald & Véron, 1963), sendo ainda mais baixo que o das espécies do mesmo género com catalase negativa, que varia entre 29 e 31 mol.% para *C. sputorum* (Sebald & Véron, 1963) e entre 34 e 38 mol.% para *C. concisus* (Tanner *et al.*, 1981).

Por outro lado, outros microrganismos semelhantes a *Campylobacter* spp. foram isolados por Ellis *et al.* (1977; 1978) e Higgins & Degre (1979) a partir de fetos abortados de bovinos, por Logan *et al.* (1982) do leite de vacas, por Gill (1983) do tracto dos órgãos genitais de bovinos, e de fezes de animais por Neill *et al.* (1985a). Também foram isoladas de humanos, bactérias com as mesmas características (Tee *et al.*, 1988). Estes microrganismos, apesar de apresentarem algumas ligeiras diferenças entre si foram incluídos numa única espécie que ficou denominada por *Campylobacter cryaerophilus*.

Mas mais tarde constatou-se que nem todas estas estirpes apresentavam uma semelhança genética congruente com a hipotética espécie. Por esta razão foi criada a espécie *Campylobacter butzleri*, que incluía aquelas estirpes que se diferenciavam geneticamente de *C. cryaerophilus* (Kiehlbauch *et al.*, 1991b).

Bactérias semelhantes às estirpes do género *Campylobacter* e inicialmente consideradas C.L.O. (*Campylobacter* Like Organisms) foram isoladas de indivíduos homossexuais com doenças diarreicas (Fennell *et al.*, 1984), e posteriormenet classificadas em duas novas espécies de *Campylobacter*: *Campylobacter cinaedi* e *Campylobacter fennelliae* (Totten *et al.*, 1985). Estirpes de *C. cinaedi* foram mais tarde isoladas de outras fontes, como as fezes de pessoas com gastroenterites (Tee *et al.*, 1987) e fezes de “hamsters” são (Gebhart *et al.*, 1989).

Em 1986, Owen & Dawson, num estudo de caracterização genética de estirpes isoladas de biópsias gástricas e que apresentavam características semelhantes aos membros de *C. jejuni* (Steele *et al.*, 1985), demonstraram que essas bactérias com actividade catalásica indefinida ou ausente, mas com sensibilidade à cefalotina, deveriam ser consideradas uma subespécie desta espécie. Dois anos mais tarde, este estudo foi confirmado pela proposta de Steele & Owen (1988), ao classificar estas estirpes como *Campylobacter jejuni* subsp. *doylei*.

Vários estudos realizados revelaram que os organismos do género *Campylobacter* representam um grupo heterogéneo, cujas relações filogenéticas com base na comparação das sequências de rRNA 16S não permitem inclui-los todos num único género (Romaniuk e Trust, 1987; Thompson *et al.*, 1988), pertencendo estas bactérias ao grupo vulgarmente designado por Proteobacteria, constituído pelas bactérias púrpura e organismos relacionados (Stackebrandt *et al.*, 1988).

Dentro deste grupo podem distinguir-se quatro super-famílias ou subclasses diferentes formadas com base em estudos dos seus ácidos ribonucleicos ribossomais (rRNA): Super-família rRNA I e II, que correspondem à subclasse gama (γ) e rRNA III e IV, as subclasses β e α , respectivamente, além da subclasse δ (Woese, 1987).

Com base nos estudos realizados por alguns autores (Romaniuk & Trust, 1987; Woese, 1987; Thompson *et al.*, 1988; Stackebrandt *et al.*, 1988) foram delineados três grupos distintos entre as espécies até então consideradas como pertencentes ao género *Campylobacter* e que posteriormente viriam a ser definidas como grupos de homologia I, II e III. Conforme ilustra a Tabela 1.1 e se descreve seguidamente, estes grupos de homologia correspondem, respectivamente, aos géneros *Campylobacter*, *Helicobacter* e *Arcobacter*.

GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III
<i>Campylobacter</i>	<i>Helicobacter</i>	<i>Arcobacter</i>
<i>C. coli</i>	<i>H. cinaedi</i>	<i>A. butzleri</i>
<i>C. concisus</i>	<i>H. fennelliae</i>	<i>A. cryaerophilus</i>
<i>C. curvus</i>	<i>H. mustelae</i>	<i>A. nitrofigilis</i> [T]
<i>C. fetus</i> [T]	<i>H. pylori</i> [T]	<i>A. skirrowii</i>
<i>C. gracilis</i>		
<i>C. helveticus</i>		
<i>C. hominis</i>		
<i>C. hyointestinalis</i>		
<i>C. jejuni</i>		
<i>C. lanienae</i>		
<i>C. lari</i>		
<i>C. mucosalis</i>		
<i>C. rectus</i>		
<i>C. showae</i>		
<i>C. sputorum</i>		
<i>C. upsaliensis</i>		

TABELA 1.1:
Apresentação dos grupos de homologia (I, II, III) e suas respectivas espécies. A espécie-tipo de cada género encontra-se assinalada com [T].

Vandamme *et al.* (1991) empreenderam uma revisão taxonómica que visava estabelecer, com base nas técnicas de hibridação genómica DNA-rRNA, as relações filogenéticas das bactérias dos géneros *Campylobacter* e *Helicobacter* com outras bactérias Gram negativas. Tendo em conta que os membros destes três grupos de homologia revelaram pouca afinidade filogenética com as quatro super-famílias de rRNA acima referidas, foi criado um quinto grupo que ficou denominado por Super-família VI ou subclasse ϵ , partindo de uma proposta anterior feita por Murray *et al.* (1990).

Os principais resultados adicionais dessa revisão descrevem-se seguidamente:

- (ii) A proximidade filogenética das espécies *Wolinella curvus* e *Wolinella rectus* levou à sua transferência para o género *Campylobacter*, adoptando-se as denominações de *Campylobacter curvus* e de *Campylobacter rectus*, respectivamente;
- (iii) Por outro lado, as espécies *C. fennelliae* e *C. cinaedi* por se diferenciarem das estirpes incluídas no género *Campylobacter* foram enquadradas no género *Helicobacter*, adquirindo novas designações, *Helicobacter fennelliae* e *Helicobacter cinaedi*, respectivamente;
- (iv) Foi proposto um novo género, *Arcobacter*, para onde foram transferidas as espécies *C. nitrofigilis* e *C. cryaerophilus* com as novas designações de *Arcobacter nitrofigilis* e *Arcobacter cryaerophilus*.

Com base nas características fenotípicas e genotípicas comuns entre as espécies de *Campylobacter* e *Arcobacter* (grupos I e III), não partilhadas com os membros do grupo II, foi proposta a criação da família Campylobacteraceae (Vandamme & De Ley, 1991), sendo o grupo II constituído pelas actuais espécies do género *Helicobacter*. Esta proposta seria aprovada e validada em 1994 pelo Sub-Comité de Bacteriologia Sistemática para Taxonomia de *Campylobacter* e bactérias afins.

Vandamme *et al.* (1992), propuseram ainda a integração das estirpes de *C. butzleri* no género *Arcobacter*, dando a esta espécie a denominação de *Arcobacter butzleri*, cuja validação pelo Sub-comité de Bacteriologia Sistemática para Taxonomia de *Campylobacter* e bactérias afins foi publicada em simultâneo com a outra espécie, *Arcobacter skirrowii*, criada com base nas estirpes antes pertencentes a *C. cryaerophilus*. As estirpes género *Arcobacter* são, na sua maioria, consideradas responsáveis por diversas patologias como a gastroenterite em alguns animais (cães, carneiros, ratos, frangos) e nos humanos.

Durante uma inspecção de rotina envolvendo um matadouro, estirpes bacterianas fenotipicamente semelhantes a *Campylobacter* foram isoladas das fezes de dois trabalhadores sem sintomas. A análise da sequência de rRNA 16S, a determinação da semelhança de DNA-DNA e da percentagem molar de G+C demonstraram que estas bactérias pertenciam a uma nova espécie, filogeneticamente próxima de *C. hyointestinalis* e *C. fetus*. Evidências de características fenotípicas e moleculares encontradas nestas bactérias levaram Logan *et al.* (2000) a propor a criação de uma nova espécie; *Campylobacter lanienae*¹.

¹ lan.i.en'ae L. N. Laniena refere-se ao matadouro onde foram isoladas as primeiras estirpes desta espécie.

Nos últimos anos, numa outra reavaliação da taxonomia infra-específica do género *Campylobacter* baseada em duas provas bioquímicas (catalase e urease), e de acordo com a proposta de On *et al.* (1998), o Sub-Comité para a Taxonomia das bactérias do género *Campylobacter* e outros grupos afins (*Helicobacter*, *Arcobacter*, *Flexispira*) repartiu em 3 biovares os membros da espécie *Campylobacter sputorum*: *C. sputorum* biovar Sputorum (catalase negativa), *C. sputorum* biovar Faecalis (catalase positiva) e *C. sputorum* biovar Paraureolyticus (urease positiva) (Vandamme & On, 2001).

Também em 2001, estirpes antes conhecidas como “Candidatus *C. hominis*” (Lawson *et al.*, 1998, citado por Lawson *et al.*, 2001), foram reclassificadas sendo proposta uma nova espécie deste género, designada por *Campylobacter hominis* (Lawson *et al.*, 2001).

Deste modo, e de acordo com a 2ª edição do Manual de Bergey de Bacteriologia Sistemática (Vandamme *et al.*, 2005), o género *Campylobacter* inclui-se no Filo Proteobacteria, Classe Epsilonproteobacteria, Ordem Campylobacterales e Família Campylobacteraceae, englobando as seguintes 16 espécies (três delas com subdivisão a nível de sub-espécie e uma a nível de biovar):

Campylobacter fetus (espécie-tipo)

Campylobacter fetus subsp. *fetus*

Campylobacter fetus subsp. *venerealis*

Campylobacter coli

Campylobacter concisus

Campylobacter curvus

Campylobacter gracilis

Campylobacter helveticus

Campylobacter hominis

Campylobacter hyointestinalis

Campylobacter hyointestinalis subsp. *hyointestinalis*

Campylobacter hyointestinalis subsp. *lawsonii*

Campylobacter jejuni

Campylobacter jejuni subsp. *jejuni*

Campylobacter jejuni subsp. *doylei*

Campylobacter lanienae

Campylobacter lari

Campylobacter mucosalis

Campylobacter rectus

Campylobacter showae

Campylobacter sputorum (inclui biovares Sputorum, Faecalis e Paraureolyticus)

Campylobacter upsaliensis

Existe ainda outra espécie, *Campylobacter insulaenigrae* (Foster *et al.*, 2004), que integra isolados obtidos de mamíferos marinhos, não incluída neste manual por ter publicação posterior à data de corte (Outubro 2003).

3. EPIDEMIOLOGIA DA CAMPILOBACTERIOSE

Foi em 1977 que Skirrow, destacando o papel das aves como reservatório primário da campilobacteriose anunciou, pela primeira vez, a gastroenterite provocada por *Campylobacter* como uma nova doença humana, considerando os seus agentes etiológicos como a causa comum da gastroenterite humana.

De facto as bactérias deste género permaneceram relativamente desconhecidas como causa de gastroenterites humanas, subestimando-se a sua importância porque a sua ocorrência está geralmente relacionada com casos esporádicos cujas fontes são raramente demonstradas (Robinson & Jones, 1981; Uyttendaele *et al.*, 1994).

Mas, embora bactérias da espécie *C. jejuni* sejam frequentemente mais isoladas, é cada vez mais evidente que outras espécies tais como *C. coli* com apenas 3% de isolamentos em indivíduos infectados, e *C. lari* estão implicadas na campilobacteriose humana quer nos casos esporádicos, quer nos surtos (Griffiths & Park, 1990).

Estas bactérias apresentam uma grande capacidade de colonização que lhes permite estabelecer uma relação de comensalismo com os seus hospedeiros, podendo posteriormente ser eliminadas através das fezes dos indivíduos infectados para o ambiente.

Na verdade, pouco ainda se sabe sobre a campilobacteriose, mas o controlo desta doença como qualquer outra, passa essencialmente por uma compreensão profunda e detalhada dos seus aspectos epidemiológicos que vão desde as fontes de contaminação até aos hospedeiros humanos, tendo em consideração os mecanismos e as causas da patogenicidade envolvidos (Wassenaar & Newell, 2000). Mas sabe-se que o grau de saneamento, o nível socio-económico e sanitário das comunidades condicionam as características epidemiológicas da campilobacteriose humana. Por isso, as características epidemiológicas da campilobacteriose dos países desenvolvidos diferem das dos países em desenvolvimento.

Nos países desenvolvidos, o isolamento de estirpes de *Campylobacter* spp. é frequente entre crianças de menos de 5 anos e adultos jovens cuja idade ronda entre 15 e 29 anos (Butzler & Skirrow, 1979; Blaser *et al.*, 1983; Amin, 1984).

No entanto, é muito frequente isolar estirpes de *C. jejuni* e *C. coli* em indivíduos de todas as idades, mesmo que previamente portadores saudáveis, com infecções de duração prolongada que, na maioria dos casos, podem constituir pequenos reservatórios de *C. jejuni*, e posteriormente, ter um papel preponderante na transmissão da doença (Skirrow, 1977; Svedhem & Kaijser, 1980).

Numa distribuição entre sexos, tem-se verificado uma incidência maior entre os homens do que entre as mulheres. Por outro lado, as variações sazonais são um factor importante na caracterização da campilobacteriose, pois são obtidas reduzidas taxas de isolamentos de *Campylobacter* durante o período que cobrem os meses de Inverno.

A diarreia do viajante é uma gastroenterite cujos aspectos clínicos e a severidade que apresenta não diferem da campilobacteriose que geralmente ocorre nos países desenvolvidos (Svedhem & Kaijser, 1980).

Os primeiros microrganismos considerados responsáveis pela chamada diarreia do viajante foram as bactérias pertencentes aos géneros *Shigella*, *Salmonella* e a espécie *Escherichia coli* (ETEC), os Rotavírus e os protozoários tais como *Giardia lamblia* e *Entamoeba histolytica*. Mas actualmente, muitos estudos demonstram que a espécie *C. jejuni* é um potencial responsável pela doença (Speelman & Struelens, 1984).

Ainda nestes países, bactérias da espécie *C. jejuni* foram associadas as causas de diarreia do viajante, sendo os alimentos crus ou insuficientemente cozinhados e o leite não pasteurizado os mais frequentemente identificados como principais fontes de contaminação desta infecção (Hayek & Cruickshank, 1977; Oosterom *et al.*, 1984).

Alguns estudos tais como o dos casos dos 1336 cidadãos britânicos regressados de uma viagem recente e dos 277 suecos provenientes de diferentes regiões do mundo (Europa, Saia, África, Médio Oriente América do Sul, Ilhas das Canárias e Hawai) em que estirpes de *C. jejuni* foram isoladas com uma taxa de 20% e 73%, respectivamente, demonstram claramente o papel destas bactérias neste tipo de gastroenterite.

Ao contrário dos países desenvolvidos, nos países em via de desenvolvimento, os indivíduos mais vulneráveis são as crianças com menos de 6 anos de idade, encontrando-se as mais elevadas taxas de infecção causada por *Campylobacter* spp. nesta faixa etária (De Mol e Bosmans, 1978; Blaser, 1980; Bokkenheuser *et al.*, 1979; Blaser *et al.*, 1984).

Resultados obtidos nalguns estudos efectuados na Índia, Bangladesh e África do Sul, revelaram que o número de isolamentos nas crianças clinicamente saudáveis pode ser superior ao das crianças com diarreia (Bokkenheuser *et al.*, 1979).

A sobrevivência de *Campylobacter* spp. nas regiões tropicais é favorecida pelas características climáticas das mesmas, que permitem uma maior frequência das infecções nestes países onde são muitas vezes constantes ao longo de toda a época chuvosa, correspondente ao verão (Taylor, 1992).

3.1. Reservatórios e fontes de contaminação

As bactérias do género *Campylobacter* spp. podem ser isoladas de uma grande variedade de hospedeiros nos quais o tracto gastrointestinal é o seu habitat natural. Os animais domésticos e selvagens, bem como as aves, são considerados os principais reservatórios destes microrganismos (Smibert, 1978; Lior, 1984).

Sabe-se que na maioria dos casos, estes hospedeiros comportam-se como portadores sãos, nos quais o número de unidades formadoras de colónias presentes pode atingir valores que se situam entre 10^6 e 10^9 por grama de fezes (Mead & Hinton, 1989).

A campilobacteriose é considerada uma zoonose, devido ao importante papel dos animais na sua transmissão (Jones & Robinson, 1981; Bolton *et al.*, 1982; Khalil *et al.*, 1993) e a ocorrência de gastroenterites nos animais não pode ser posta em dúvida, embora possa haver isolamento de bactérias deste género em animais sem sintomatologia (Doyle & Roman, 1982; Prescott & Munroe, 1982; Blaser *et al.*, 1984; Rosef *et al.*, 1983; Humphrey & Beckett, 1987; Beumer *et al.*, 1988).

No entanto, o facto das estirpes de *Campylobacter* spp. serem ubíquas no ambiente justifica a ocorrência de casos maioritariamente esporádicos em detrimento de surtos que são raros. Na verdade, este facto tem dificultado bastante a determinação das fontes desta infecção. Por isso, o controlo de intoxicações alimentares causadas por bactérias patogénicas como os campilobacteres depende em grande parte da identificação das fontes e vias de transmissão.

3.1.1. Aves

Muitos estudos realizados de *Campylobacter* spp. têm demonstrado que microrganismos deste género são frequentemente isolados das aves, particularmente de frangos, constituindo o principal reservatório das estirpes em vários casos de gastroenterites humanas (Skirrow, 1977, Skirrow & Benjamim, 1980b). Segundo Skirrow & Benjamim (1980b), as características das estirpes geralmente isoladas de frangos são particularmente semelhantes às de *Campylobacter* spp. de proveniência humana.

Em geral, o isolamento de *Campylobacter* em frangos apresenta uma taxa de incidência que pode variar entre 80 e 100% de isolados para cada lote de amostragem que se efectua (Gomes *et al.*, 1996).

No entanto, apesar das elevadas taxas reflectirem uma eminente contaminação, verifica-se que aves do mesmo aviário conseguem escapar a esta infecção (Robinson & Jones, 1981). Isto justifica o isolamento, por alguns autores, de estirpes de *C. jejuni* que não fazem parte da flora microbiana intestinal normal das aves (Cruickshank *et al.*, 1982; Blaser *et al.*, 1983).

A colonização dos frangos por *C. jejuni* ocorre geralmente entre a 3ª e 4ª semanas de idade, propagando-se a sua transmissão horizontalmente dentro do aviário. Esta situação de colonização permanece, geralmente, até a fase de seu processamento no matadouro, podendo muitas vezes, nesta fase, o isolamento destas bactérias atingir os 100% de amostras (Jacobs – Reitsma *et al.*, 1995; Gomes *et al.*, 1996).

As aves têm uma função dupla na campilobacteriose que consiste no facto de, ao mesmo tempo que se apresentam como um dos potenciais reservatórios das estirpes de *Campylobacter* spp., elas constituem também um veículo de transmissão que não deve ser subestimado nos estudos epidemiológicos desta infecção. Este grupo de vertebrados pode, através das fezes contaminar as águas de superfície, os pastos, as forragens e o solo (Kapperud & Rosef, 1983; Whelan *et al.*, 1988).

O consumo de carne de frango totalmente cozinhada (“bem passado”), ou frango cru (“mal passado”), bem como a carne de aves contaminada constituem uma das fontes de contaminação para muitos casos de surtos de campilobacteriose nos humanos (Deming *et al.*, 1987).

Já em 1962, King chamara a atenção sobre o papel de *C. jejuni* como causa de hepatite nas aves domésticas, sugerindo pela primeira vez o conceito de fonte primária que atribuiu às aves, no caso da infecção humana.

No entanto, frangos não colonizados ou com um número reduzido de estirpes de *Campylobacter* spp. podem ser obtidos, se esses forem mantidos em melhores condições de higiene (Sjögren & Kaijser, 1989), ou ainda proceder-se a uma protecção de pintos a partir do primeiro dia de vida, utilizando uma prévia exposição à microflora natural intestinal que induz limitações à colonização por *C. jejuni* nos períodos de crescimento e engorda nos aviários (Soerjadi-Liem, *et al.*, 1984).

As estirpes de *C. coli* e *C. jejuni* têm sido também isoladas das outras aves domésticas e selvagens (Butzler & Skirrow, 1979; Kapperud & Rosef, 1983), incluindo o pardal e os pombos (Smibert, 1969), e as estirpes neles isoladas têm revelado semelhanças com as estirpes provenientes tanto dos carneiros como dos ovinos. Estas espécies foram também encontradas em gansos e patos (Luetchefeld *et al.*, 1980), e nas gaivotas (Glunder *et al.*, 1992),

A criação de animais tais como suínos, ovinos e bovinos em paralelo com os frangos pode aumentar os riscos de colonização destas aves por *Campylobacter* spp.. Os efluentes de matadouros de frangos são também considerados uma potencial fonte de contaminação (Höller, 1988; Koenraad *et al.*, 1995).

3.1.2. Bovinos

Os animais deste grupo podem desenvolver ou não a gastroenterite causada por *Campylobacter* spp., sendo a idade um dos factores mais importantes na ocorrência de sintomas (Robinson & Jones, 1981). Neste caso particular, as estirpes de *C. jejuni* são as mais frequentemente isoladas dos animais adultos (Grau, 1998) contrariamente aos suínos, nos quais os animais mais jovens são os mais vulneráveis (Weijtens *et al.*, 1993).

Segundo Robinson & Jones (1981), a prevalência de excreção fecal das bactérias deste género pode variar consideravelmente de acordo com as épocas sazonais, e o estabelecimento da infecção é muito mais fácil nos animais jovens, com grande possibilidade de persistência nos adultos. Estes autores constataram ainda que estas infecções sintomatológicas persistentes, ou até mesmo a colonização de rebanhos de vacas leiteiras, nem sempre implicam ocorrência de contaminação do leite.

Um outro aspecto importante que este estudo revelou é que, apesar de haver pouca evidência de infecções cruzadas entre estes animais, é possível encontrar diferentes estirpes de *Campylobacter* spp. no mesmo rebanho.

3.1.3. Suínos

Segundo Karmali & Skirrow (1984), a frequência mais elevada de *Campylobacter* spp. em suínos é atribuída à estirpes de *C. coli*, embora Smibert (1978) tenha considerado a espécie *C. jejuni* como membro natural do intestino de suínos, destacando a sua presença nos animais mais jovens. Este autor considerou ainda que o isolamento destas bactérias é facilitado por provável ausência de outros microrganismos patogénicos no tracto gastrointestinal dos referidos animais.

No entanto, deve dizer-se que não parece provável que gastroenterites humanas associadas às estirpes de *Campylobacter* spp. sejam devidas a contaminação através de suínos, pois as estirpes isoladas destes animais são geralmente diferentes das encontradas nos humanos (Banffer, 1985).

3.1.4. Cães e gatos

Estes animais têm sido relatados como potenciais reservatórios de *Campylobacter* spp. (Bruce, *et al.*, 1980; Skirrow, 1981b; Cabrita, 1986) e consequentemente identificados por alguns autores como veículos de transmissão de *C. jejuni* para o homem (Skirrow, 1981b; Norkrans & Svedhem, 1982; Nair *et al.*, 1985).

Devido ao sistema imunitário ainda pouco desenvolvido, os animais mais jovens deste grupo de mamíferos são os que, mais frequentemente, desenvolvem a infecção com diarreia, enquanto que nos animais adultos é frequente isolarem-se estirpes de *Campylobacter* spp., sem que estes apresentem sintomas (Fox *et al.* 1983; Torre & Tello, 1993).

Na verdade, a ocorrência desta infecção nos cães e gatos constitui um risco para a saúde pública, uma vez que estes animais são considerados os melhores e mais próximos companheiros do homem. A frequência comum e as elevadas taxas de isolamento de *C. jejuni* nestes animais podem ainda resultar da ocorrência de contaminações cruzadas que se verificam entre cães ou gatos em canis e gatis, respectivamente (Torre & Tello, 1993).

Nos cães da raça Beagles, geralmente considerados um importante reservatório de *C. jejuni*, Fox *et al.* (1988) constataram que as estirpes de *Campylobacter* spp. isoladas desses mamíferos eram semelhantes às provenientes de surto de gastroenterites humanas. As estirpes de *C. jejuni* podem ser isoladas dos cães com diarreia ou dos animais saudáveis. No entanto, as taxas de isolamentos são maiores nos cães selvagens do que nos domésticos (Blaser *et al.*, 1980a; Bruce *et al.*, 1980).

3.1.5. Leite e água

Tanto o leite como a água são fontes de contaminação frequentemente relatadas nos casos de surtos de campilobacteriose. A sua importância como veículos de contaminação está ligada à sua produção e dos seus derivados, bem como à sua extensa e rápida distribuição na rede de comércio para o consumo alimentar.

No caso do leite, a sua importância ficaria muito limitada se forem considerados apenas os casos de surtos, na medida em que exames de diagnóstico serológico revelam que indivíduos que tomam regularmente leite cru são expostos com uma frequência mais elevada que o normal às infecções causadas por *Campylobacter* spp.

Neste contexto o diagnóstico serológico revela-se muito útil na identificação destes agentes microbianos nos casos de surtos. Isto porque indivíduos com sintomas mostram sempre elevadas taxas de resposta, enquanto que indivíduos sãos apresentam taxas mais baixas ou ausência de resposta serológica.

Embora vários estudos revelem que estas bactérias não se multiplicam no leite nem em condições ambientais nem de laboratório, Blaser *et al.* (1980a) provaram que elas sobrevivem à temperatura ambiente e à 4°C, durante cerca de 24 horas e 3 semanas, respectivamente, enquanto que estirpes de *C. jejuni* não resistem às temperaturas de pasteurização.

Deste modo, pode dizer-se que o processo de pasteurização, quando é correctamente aplicado, permite a eliminação eficaz de *Campylobacter* do leite (Robinson & Jones, 1981). No entanto, outros casos de infecções de *Campylobacter* spp. associadas ao consumo do leite, proveniente de animais leiteiros como a cabra foram descritos por Harris *et al.* (1987).

A água é também uma das fontes mais importantes de contaminação por *Campylobacter*, pois evidências epidemiológicas e microbiológicas têm demonstrado a associação deste “bem” de consumo básico das populações às infecções por estas bactérias.

Embora se verifique a ocorrência de muitos casos esporádicos de campilobacteriose, um número substancial de surtos tem sido relatado em muitos estudos em associação com a água contaminada (Vogt *et al.*, 1982). A contaminação fecal da água por aves, morcegos (Palmer *et al.*, 1983; Knill *et al.*, 1982), insectos (Khalil *et al.*, 1994) e também pelo homem, é uma das mais prováveis fontes de propagação da campilobacteriose.

O estabelecimento da relação epidemiológica entre o agente e a fonte de contaminação consiste no isolamento de estirpes ou serotipos semelhantes quer da fonte em questão (água), quer dos indivíduos infectados (Palmer *et al.*, 1983; Taylor *et al.*, 1983; Aho *et al.*, 1989).

No entanto, esta relação é muitas vezes difícil de estabelecer. Por esta razão, constata-se que muitos autores ao investigarem surtos de *Campylobacter* limitam-se a relatar a sua suspeita sobre a fonte de contaminação por não terem conseguido isolar estas bactérias da água de consumo (Mentzing, 1981) e de superfície (Perkins–Jones *et al.*, 1982). Em contrapartida, estudos realizados por outros autores têm revelado uma presença quase regular de *Campylobacter* neste habitat (Taylor *et al.*, 1983; Pearson *et al.*, 1985; Bolton *et al.*, 1987a).

3.1.6. Solos e outros ambientes.

No solo, como em muitos outros ambientes inanimados, a sobrevivência dos campilobacteres depende muito das condições ambientais a que estão submetidos (Lindenstruth & Ward, 1948).

Estirpes de *Campylobacter* spp. podem ser isoladas em amostras de solo sujeitas a temperaturas de pelo menos 6°C durante 20 dias. Contudo, a probabilidade de isolamento é reduzida com a diminuição da temperatura. No entanto, estirpes de *C. jejuni* presentes em fezes de cães e humanos infectados podem sobreviver durante 3 semanas a temperaturas de 4°C.

Por esta razão, a contaminação fecal deste meio faz do solo um provável reservatório provável destas bactérias que pode constituir uma potencial fonte de contaminação para a infecção por *Campylobacter* quando as condições de temperatura são moderadamente baixas.

3.1.7. Outras fontes associadas e implicações da campilobacteriose

Os riscos de contrair uma infecção por *Campylobacter* estão também associados a outras fontes tais como: a contaminação cruzada entre os diferentes reservatórios, as falhas nos processos de pasteurização dos produtos enlatados tais como o leite e os seus derivados, na preparação, manipulação e conservação dos alimentos nas unidades de produção e/ou de processamento, nomeadamente aviários, matadouros, talhos, restaurantes, etc. (Park *et al.*, 1991).

Os alimentos crus ou mal cozinhados de origem animal são frequentemente relatados como veículos de transmissão nas intoxicações alimentares.

Esta infecção acarreta consequências bastante significativas do ponto de vista económico dado que implica a perda de dias de trabalho para tratamento além dos custos monetários associados (Koenraad *et al.*, 1995). São ainda bastantes elevadas e substanciais, as implicações económicas da campilobacteriose, tanto na saúde pública (contaminação da água, alimentos, etc.) como na indústria alimentar, particularmente no que diz respeito à produção, preparação e comercialização de carne de frangos e outros animais, assim como do leite e seus derivados que têm sido identificados como principais veículos de transmissão da doença para o homem (Healing *et al.*, 1992).

Por outro lado, como referiram Blaser *et al.* (1980b) e Robinson (1981), a dose infectante requerida para produzir a doença (campilobacteriose) diminui as hipóteses de transmissão de *Campylobacter* spp. por contacto directo (indivíduo para indivíduo).

3.2. Incidência

A campilobacteriose tornou-se numa das infecções diarreicas mais frequentemente relatadas, assistindo-se a um aumento considerável dos números de casos nos países desenvolvidos tais como a Inglaterra, os Estados Unidos, a França e o Canadá (Gibson & Owen, 1998; Nielsen, *et al.*, 2000).

De uma forma geral, o isolamento de estirpes de *Campylobacter* spp. pode atingir os 3 a 14% em indivíduos doentes com diarreia, contra apenas 1% nos que não apresentam quaisquer sintomas desta infecção (Bruce *et al.*, 1977).

Em muitos casos, a incidência de *Campylobacter* spp. tem-se revelado mais elevada que a de *Salmonella* spp. ou *Shigella* spp., atingindo em certas circunstâncias uma percentagem de isolamento mais elevada que a das infecções causadas por estas bactérias (Walder, 1982; Franco, 1988).

Um estudo realizado em Seattle revelou uma incidência de campilobacteriose 2,5 vezes superior à de salmonelose enquanto que, ao nível de todo país (Estados Unidos), a estimativa anual rondou valores entre 68,7 e 275 milhões de casos de doenças diarreicas, estimando-se uma média anual de 0,29 a 1,1 casos em cada americano (Douglas & Kvenberg., 1985).

No entanto, apesar de se ter registado mais de 2 milhões de casos/ano de infecções provocadas por *Campylobacter jejuni*, em certos países industrializados como os Estados Unidos da América, é ainda muito difícil determinar a incidência real deste agente no mundo inteiro.

Isto porque em muitos países, particularmente nas regiões em via de desenvolvimento, a não inclusão destas bactérias nos exames de rotina efectuados nos laboratórios clínicos não permite as autoridades de saúde pública obter informações necessárias de registos sobre a sua incidência (Murray *et al.*, 1998).

Mesmo assim, nestes países, a taxa de isolamento de *Campylobacter* atinge números bastantes elevados que podem variar entre 8 e 31% nos indivíduos com diarreia enquanto que os casos de indivíduos assintomáticos podem variar entre 5 e 7%.

Esta dificuldade deve-se ainda à falta ou a escassez de métodos adequados e facilmente disponíveis para a identificação ou tipificação das estirpes de *Campylobacter* spp., que são responsáveis pela campilobacteriose humana (Wassenaar & Newell, 2000).

Num período compreendido entre 1977 e 1981, estudos realizados em algumas regiões dos Estados Unidos revelaram uma incidência total acima dos 500 indivíduos infectados com as bactérias do género *Campylobacter* (Taylor *et al.* 1979; Blaser *et al.* 1979; CDC, 1981a; CDC, 1981b; Taylor *et al.* 1982; Potter *et al.* 1983).

Em 1999, o relatório anual dos Serviços de Saúde da Grã-Bretanha registou uma tendência de aumento na incidência de campilobacteriose, tendo sido detectados em 1998, 58 000 casos associados a esta infecção. E, este número foi muito mais elevado que dos casos de salmonelose no mesmo ano, acrescenta o documento (Anónimo, 2000).

Por outro lado, em 1999, na Dinamarca, o relatório anual sobre zoonoses relata que, durante um período de sete anos (1992-1999), os números de casos de campilobacteriose triplicaram, passando de 22 entre 1980 e 1992 a 78 /100,000 habitantes em 1999. Mas, para além disso, o relatório refere-se ainda ao envolvimento de 95% das estirpes de *C. jejuni* subsp. *jejuni* (Anónimo, 2000).

3.3. Patogénese, sintomas, prevenção e tratamento

3.3.1. Dose infectante

A infecção por *Campylobacter* pode ter início com uma dose infectante mínima de apenas 100 ou 500 microrganismos, enquanto que valores que atingem 800 UFC podem desencadear a doença que se manifesta pelo aparecimento de diferentes sintomas.

As possíveis variações na dose infectante mínima necessária das estirpes de *Campylobacter* spp. para se produzir a doença não depende só da virulência do agente infectante (espécies, estirpe), mas também da fonte de contaminação (suínos, frangos, bovinos, etc.), e de um conjunto de factores que podem determinar a susceptibilidade do hospedeiro para a infecção.

O valor da dose mínima infectante dos campilobacteres varia sobretudo de indivíduo para indivíduo como demonstram os diferentes estudos que se seguem.

Em 1981, Robinson ingeriu 180 ml de leite contendo 500 células de *C. jejuni* isoladas de um surto no qual o leite foi implicado, conseguindo provocar a infecção.

Butzler *et al.* (1985) estimaram a ID₁₀ (dose infectante necessária para provocar a doença em 10% de indivíduos expostos) com um valor de 10⁵ microrganismos para as estirpes de *C. jejuni*. Este valor foi determinado pela média encontrada entre 10² e 10⁸ que correspondem às doses infectantes mínimas de estirpes de *Shigella* spp. e de *Salmonella* spp., respectivamente.

Mais tarde, Blaser (1988) constatou que a ingestão de 10⁸ a 10⁹ e 10⁵ UFC de duas estirpes de *C. jejuni*, por alguns indivíduos voluntários, permitiu o desenvolvimento da gastroenterite em cerca de 45 e 18%, nas respectivas doses utilizadas.

Entretanto, Black *et al.* (1988), utilizando o mesmo tipo de experiência mas fazendo uso de doses de 800 e 10⁶ organismos, verificaram que 10 a 50% destes voluntários apresentaram as sintomas da doença. Portanto, uma variabilidade de opiniões demonstrada sobre a matéria, leva a acreditar não existirem valores absolutos para expressar a dose mínima necessária para desencadear a infecção causada pelas estirpes de *Campylobacter* spp.

3.3.2. Mecanismos de patogénese

Embora não sejam ainda completamente conhecidos os mecanismos de patogenicidade da doença diarreica causada pelas estirpes de *Campylobacter* spp., muitos investigadores sugerem a mobilidade, a aderência, a invasibilidade, assim como a produção de enterotoxinas e citotoxinas como potenciais factores da virulência nestas bactérias (Ruiz-Palacios, 1992; Snelling *et al.*, 2005).

Segundo alguns estudos efectuados com diversos grupos bacterianos (*Campylobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *E.coli*, etc.), responsáveis pelas gastroenterites humanas, o processo de colonização do tracto intestinal está intimamente associado à presença de flagelos polares, sendo a mobilidade um dos passos mais importantes na patogenicidade destas bactérias (Marooka *et al.* 1985; Lee *et al.*, 1986; Arp, 1988). Por outro lado, a importância dos flagelos neste processo ficou patente quando diversos estudos demonstraram que mutantes desprovidos de flagelo (imóveis) apresentavam capacidade reduzida ou ausente na colonização da mucosa epitelial (Borst e Greaves, 1987; Beery *et al.*, 1988; Black *et al.*, 1988).

Muitos autores realçam a importância da adesão como um processo assegurado pela existência de adesinas que seriam provavelmente localizadas nos flagelos e em vários outros componentes da superfície celular bacteriana tais como os lipopolissacáridos; outros sugeriram as criptas intestinais e a superfície mucosa como locais preferenciais da colonização para *Campylobacter*, considerando a aderência um processo menos importante no mecanismo de patogenicidade das estirpes de *C. jejuni* (Lee *et al.*, 1986).

Num estudo sobre a influência de *C. jejuni* na quimiotaxia de neutrófilos humanos, Hasselik *et al.* (1996) demonstraram a produção de um factor com actividade quimiotáctica para PMNL (leucócitos polimorfonucleares), sugerindo a importância deste factor na atracção de PMNL aos locais da infecção.

A descoberta foi importante na pesquisa dos mecanismos de patogenicidade de *Campylobacter*, uma vez que a actividade estimuladora de neutrófilos pode ajudar a elucidar certos mecanismos de inflamação que envolvem a diarreia causada por *C. jejuni*.

Segundo alguns investigadores, as estirpes de *C. jejuni* e *C. coli* produzem uma enterotoxina semelhante à toxina colérica (C.T) detectada nas estirpes de *V. cholerae* (Ruiz-Palacios *et al.*, 1983; Gossens *et al.*, 1985; Johnson & Lior, 1988). Esta enterotoxina pode ser detectada nas fezes tanto de indivíduos com diarreia como de portadores assintomáticos (Mandal *et al.* 1984).

Na verdade a gastroenterite provocada por *C. jejuni* é do tipo inflamatório. Tanto as estirpes de *C. jejuni* como as de *C. coli*, produtoras de enterotoxina, são isoladas de doentes com diarreia. Segundo Ruiz-Palacios *et al.* (1983), a enterotoxina detectada nas estirpes deste *Campylobacter* termófilo tem a capacidade de induzir a acumulação de fluídos e electrólitos nas ansas de intestino de alguns animais.

A presença da citotoxina nas bactérias deste género foi demonstrada pela primeira vez utilizando uma linha de células humanas. Segundo Klipstein *et al.* (1985), estirpes de *Campylobacter* spp. produtoras de citotoxina são geralmente detectadas nas fezes de indivíduos infectados que apresentam uma diarreia do tipo inflamatório.

Estudos realizados por alguns investigadores demonstraram que estirpes de *C. jejuni* isoladas de amostras clínicas de origem humana e animal produziam citotoxina, enquanto que em estirpes provenientes de outras origens como a água o mesmo não se verificava (Newell *et al.*, 1985.), sugerindo assim que a passagem destas bactérias pelos intestinos potencia a sua virulência e capacidade patogénica.

Uma outra citotoxina designada por Toxina Citoletal Distensora (Cytoletal Distending Toxin) tem sido caracterizada detalhadamente entre várias citotoxinas já identificadas nas estirpes de *Campylobacter* spp. (Jonhson & Lior, 1988; Bang *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003), tendo sido identificados e clonados os genes envolvidos (genes *cdt*; Picket *et al.*, 1996).

Esta toxina tem demonstrado uma grande capacidade de distensão progressiva de várias linhas celulares, provocando posteriormente a sua morte (Jonhson & Lior, 1988; Bang *et al.*, 2001), e há indicações de que a forma de actuar desta citotoxina difere da das outras toxinas (Picket & Whitehouse, 1999).

Ultimamente, a produção da toxina CDT foi descrita por Bang *et al.* (2003), tendo sido detectados os genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* em 100% dos isolados de *Campylobacter* spp. investigados.

Este estudo demonstrou que as estirpes de *C. coli* isoladas de suínos produziram maior quantidade de título de CDT que as estirpes da mesma espécie mas provenientes de outras fontes, sugerindo assim uma certa capacidade adaptativa das bactérias pertencentes a espécie de *C. coli* para este grupo de animais (suínos).

Recentemente, outros factores de virulência tais como o plasmídeo *pVirB11* têm sido descritos na patogénese de *Campylobacter* spp (Bacon *et al.*, 2000). Estes estudos relatam uma prevalência do plasmídeo *pVirB11* de 7.5 e 10.3% entre 54 estirpes de *C. jejuni* e 4 de *C. coli*.

3.3.3. Sintomas ou manifestações clínicas

Os surtos descritos nas infecções de *Campylobacter* spp. abrangem geralmente diversos níveis de comunidades. Esses podem ser: famílias isoladas, conjuntos de famílias, bairros, regiões ou comunidades maiores, assim como instituições tais como escolas, fábricas, equipas, empresas, etc.

Estudos existentes demonstram que as estirpes de *Campylobacter* spp. são na sua maioria sensíveis ao ácido gástrico, porém a passagem desta barreira no tracto gastrointestinal pode permitir-lhes encontrar um meio microaerófilo favorável tanto para a sua sobrevivência como para a sua multiplicação (Mandal *et al.*, 1984).

As estirpes de *Campylobacter* spp. enteropatogénicas invadem o intestino delgado e/ou grosso, onde através da expressão do seu potencial patogénico provocam a campilobacteriose.

Esta infecção assume diversas formas de manifestação que variam desde as mais simples (ausência de sintomas) até a septicemia fulminante, embora muito raramente ocorra morte. Podem também surgir inflamações exsudativas, produção de úlceras ou até mesmo lesões hemorrágicas da mucosa.

No entanto, apesar dos sintomas geralmente apresentados pelos indivíduos infectados serem comuns a outras infecções diarreicas de origem bacteriana como a da salmonelose, shigelose, e infecções provocadas pelas bactérias *Clostridium difficile* ou ainda pelo protozoário *Ameba*, na campilobacteriose é frequente, como já foi referido, ocorrerem infecções assintomáticas cuja taxa de incidência é muito baixa (cerca de 1%).

Estas infecções estão geralmente associadas a exposições prolongadas a estas bactérias, e conseqüentemente os indivíduos afectados apresentam um teor do título de IgA anti-*Campylobacter* muito elevado (Blaser *et al.*, 1985).

Os sintomas ou manifestações clínicas observados em casos de campilobacteriose podem ter uma duração que varia entre 24 horas a algumas semanas. Mas estas manifestações clínicas podem ainda permanecer visíveis nos indivíduos infectados num período variável, que pode ser de um a sete dias após a infecção.

Esta infecção caracteriza-se ainda por dores gastrointestinais passageiras ou enterocolites acompanhadas de dores abdominais e frequentemente de diarreia, vómitos e náuseas. Segundo alguns estudos, nos países em desenvolvimento, é muito frequente os indivíduos infectados apresentarem diarreia profusa, ou ainda sanguinolenta (Butzler & Skirrow, 1979; Blaser, 1982).

Em geral, o estado clínico da campilobacteriose num indivíduo doente é também caracterizado por febre com temperaturas superiores a 37,5°C, atingindo por vezes os 40°C. Estas temperaturas elevadas são também, por vezes, seguidas de um quadro de manifestações sintomatológicas como as cefaleias e raramente, de dores abdominais pré-umbilicais.

Quando a infecção atinge proporções significativas, as excreções podem muitas vezes ser eliminadas com sangue fresco, pus e/ou muco que geralmente indicam a possibilidade de uma infecção colo-rectal por estas bactérias, como demonstraram os exames de sigmoidoscopia e biópsia rectal efectuados por Lambert *et al.* (1987).

Segundo Mandal *et al.* (1984), uma infecção diarreica aguda é frequentemente descrita nos países subdesenvolvidos e uma observação microscópica dos produtos de excreção revela muitas vezes, além das células bacterianas do agente etiológico (*Campylobacter* spp.), a presença de exsudados inflamatórios.

3.3.4. Outras complicações clínicas associadas à campilobacteriose

Durante a campilobacteriose, podem ocorrer outras complicações acompanhadas de distúrbios e hemorragias gastrointestinais, provocando dores abdominais nos indivíduos jovens, particularmente adolescentes. Em certas circunstâncias, estas infecções são confundidas com apendicite, levando a intervenções cirúrgicas apenas por suspeita (Allos & Blaser, 1995).

De facto a apendicite e outras complicações tais como a colecistite, a peritonite e a pancreatite podem ser originadas por estes microrganismos. Isolados de *C. jejuni* têm também sido associados, em indivíduos homossexuais, a infecção da próstata.

O síndrome de Guillain-Barré (GBS), doença caracterizada por uma paralisia neuromuscular aguda, é uma das complicações mais frequentemente associadas às infecções causadas por *C. jejuni*² (Jacobs *et al.*, 1996). Mas apesar disso, o desenvolvimento do GBS não está relacionado com o grau de severidade verificada nas infecções causadas por *C. jejuni* que o precedem. Portanto a doença pode desenvolver-se mesmo nos indivíduos com infecções assintomáticas.

No entanto, é ainda objecto de uma certa controvérsia a afirmação de alguns autores que consideram o síndrome de Guillain-Barré precedido da infecção causada por *C. jejuni* como o mais severo de todos (Kaldor & Speed, 1984; Wroe & Blumhardt, 1985)

3.3.5. Prevenção e tratamento da doença

Além dos casos de septicémia que requerem um tratamento específico com antibióticos, sabe-se que esta infecção (campilobacteriose) é auto-limitante.

A diarreia e os vômitos podem, em algumas circunstâncias, provocar desidratação suficiente para induzir um desequilíbrio electrolítico nos infectados, podendo conduzir ao seu internamento. Nestes casos, a reposição do equilíbrio electrolítico por simples rehidratação pode ser suficiente para resolver o problema.

² Dois em cada três casos, a doença de Guillain-Barré é precedida de uma infecção causada por *Campylobacter jejuni*.

No entanto, em circunstâncias que podem levar a situações inesperadamente graves, é clinicamente recomendado o uso de medicamentos. Neste caso, a eritromicina continua a ser, em detrimento de algumas quinolonas (ciprofloxacina, enrofloxacin e ácido nalidíxico), o antibiótico de eleição para tratar desta infecção.

Entretanto, nos países em desenvolvimento, há conhecimento da ocorrência de casos de morte devida a negligência e/ou a falta de meios clínicos. Sabe-se ainda que a infecção por *Campylobacter* pode durar longos períodos (duas a três semanas), enquanto noutras circunstâncias a recuperação pode ser mais rápida, durando apenas dois dias.

PARTE II

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DOS ISOLADOS DE CAMPYLOBACTER

INTRODUÇÃO GERAL

Em muitos estudos existentes, as estirpes de *C. jejuni* e *C. coli* são os principais responsáveis das gastroenterites humanas, sendo por isso considerados os mais importantes agentes gastro-enteropatogénicos do género. Por outro lado, membros destas duas espécies partilham diversas características clínicas comuns, tornando por isso, algo mais embaraçosa, a identificação e/ou diferenciação destas espécies.

Há mais de duas décadas, vários métodos convencionais têm sido utilizados na identificação e tipificação das estirpes de *Campylobacter* spp. A diferença entre estes métodos reside principalmente no poder de discriminação que cada um deles tem.

Os processos de caracterização fenotípicos ou convencionais das bactérias, e que são particularmente utilizados na identificação das estirpes de *Campylobacter* spp., baseiam-se na selecção das culturas em placa e, em seguida, na caracterização dos isolados através de métodos tais como a serotipagem, a fagotipagem, a identificação bioquímica ou biotipagem e a resistotipagem (Van Doorn *et al.*, 1997). Pode recorrer-se ainda a análise de perfis electroforéticos das proteínas celulares e/ou dos ácidos gordos. Mas, a importância e a utilização de cada um destes métodos dependem muito das suas respectivas vantagens e desvantagens.

1. Biotipagem

A biotipagem consiste numa série de testes que permitem a avaliação da capacidade que um organismo tem para produzir ou utilizar determinadas compostos. No caso particular de *Campylobacter*, as maiores limitações que este método apresenta consistem nas inúmeras inconsistências encontradas nas diversas propriedades bioquímicas utilizadas na caracterização das estirpes.

As bactérias do género *Campylobacter* são consideradas relativamente inertes do ponto de vista bioquímico, pois além de não oxidarem, não fermentam os hidratos de carbono (On, 1996). E, em consequência disso, existem poucas provas bioquímicas para diferenciar os membros das diferentes espécies do grupo.

Por outro lado, acontece também que algumas das propriedades bioquímicas utilizadas na identificação destas bactérias dependem da idade das culturas e das condições de execução das provas (Wassenaar & Newell, 2000).

Três métodos de biotipagem são mais frequentemente utilizados para identificar e diferenciar as espécies termófilas de *Campylobacter* spp., nomeadamente: o método de Lior (1984), o chamado sistema de Preston (Bolton *et al.*, 1984) e o API-Campy (Huysmans *et al.*, 1995). Este último é um kit que pode ser facilmente adquirido no comércio.

A diferenciação tradicional entre *C. jejuni* e as outras espécies termófilas, como *C. coli*, através das provas bioquímicas sempre foi um processo problemático, uma vez que esta se baseia, única e exclusivamente na capacidade que as estirpes de *C. jejuni* têm para hidrolisar o hipurato de sódio, sabendo-se que existem estirpes *C. jejuni* hipurato negativo (Harvey, 1980), pelo que se obtêm resultados falsos que podem comprometer a identificação e/ou a diferenciação destas bactérias. Neste caso, estas bactérias exibem uma identidade fenotipicamente atípica que deve ser verificada, submetendo as estirpes a outros métodos potencialmente discriminatórios.

Há alguns anos, pensou-se mesmo na utilização de testes fenotípicos adicionais que incluem a actividade α -hemolítica e o crescimento das estirpes em meio mínimo. No entanto, apesar de se terem revelado úteis na identificação destes microrganismos, estas técnicas não foram eficazes para satisfazer as expectativas criadas em torno da questão de diferenciação entre *C. jejuni* e *C. coli*, pois verificou-se que os mesmos requerem uma padronização estrita. Por esta razão, estas técnicas são raramente usadas em laboratórios como testes de rotina (On, 1996).

Mas apesar de tudo, sabe-se que a prova de hidrólise de hipurato continua a ser utilizada nos laboratórios, sendo a diferenciação entre estirpes de *C. jejuni* e *C. coli* complementada com a utilização de um leque de novos esquemas baseados na caracterização genotípica das estirpes destas espécies (ver mais adiante).

Actualmente, não se conhece um único método fenotípico com capacidade de identificar todas as espécies de *Campylobacter* spp., que até hoje se conhecem.

Das diversas desvantagens encontradas na aplicação de métodos fenotípicos incluem-se as seguintes: o reduzido poder de discriminação entre estirpes não relacionadas, uma pobre reprodutibilidade e a baixa taxa de tipificação, além de tantas outras acima já referenciadas.

Na verdade, as limitações dos métodos convencionais, geralmente utilizados nos processos de identificação e diferenciação de *C. jejuni* e *C. coli*, suscitaram um crescente e considerável interesse na necessidade de se desenvolver outro tipo de métodos tais como os denominados métodos químicos e moleculares ou genotípicos.

Por outro lado, métodos baseados em conteúdos proteicos e de ácidos gordos foram desenvolvidos para a identificação dos organismos. Na verdade, admite-se que a presença ou a ausência de determinados compostos tais como as proteínas e os ácidos gordos é específicos para os organismos, pelo que uma determinação quer qualitativa, quer quantitativa destas substâncias pode permitir a identificação de estirpes.

Com a introdução destes parâmetros na taxonomia nasceram os conceitos de quimiotaxonomia e Quimiosistemática. Os métodos quimiotaxonómicos, embora raramente pelas razões que mais a frente serão referidas, são também utilizados na identificação das estirpes de *Campylobacter* spp.

2. Resistotipagem

A resistotipagem é baseada nos testes de sensibilidade de um organismo a um conjunto de antibióticos previamente seleccionados. No entanto, há mais de duas décadas, o método tem vindo a ser utilizado como parte integrante dos testes da biotipagem para a caracterização fenotípica das estirpes de *Campylobacter* spp. Assim, diferentes sistemas de biotipagem conhecidos (Lior 1984; Sistema de biotipagem API-Campy; Sistema de biotipagem de Preston) integram alguns testes de susceptibilidade aos antibióticos cujos números variam de uma técnica para outra (Tabela 2.1).

A determinação dos resistotipos pode ainda ser obtida através de outras técnicas que, na verdade, derivam das modificações de testes de sensibilidade aos antibióticos utilizados no sistema de biotipagem de Preston.

Estas técnicas, o sistema de MAST-test e o Sistema de Ribeiro *et al.* (1996) utilizam apenas 5 dos 10 testes do sistema de Preston e podem ser adquirido facilmente no comércio. Com estes métodos, é possível definir resistotipos entre estirpes de *Campylobacter* spp..

A sensibilidade ao ácido nalidíxico foi sempre utilizada para distinguir as espécies tradicionalmente sensíveis como *C. jejuni* e *C. coli* da espécie resistente tal como *C. lari* com qual formam o grupo termófilo. Segundo alguns autores, a resistotipagem apresenta maior discriminação que a biotipagem na identificação das estirpes de *Campylobacter* spp. (Ribeiro *et al.*, 1996, Owen *et al.*, 1997).

No entanto outros estudos têm revelado que *C. jejuni* e *C. coli* podem partilhar os mesmos resistotipos. O que significa que este método por si só não é capaz de distinguir as espécies de *Campylobacter*.

Na TABELA 2.1 apresentam-se os sistemas de restotipagem utilizados nas técnicas de biotipagem das estirpes de *Campylobacter* spp..

O aumento das taxas de isolamento de estirpes de *Campylobacter* spp. resistentes a um número cada vez mais maior dos antibióticos tais como as quinolonas, tetraciclina, kanamicina etc., tem reduzido muito o valor taxonómico de avaliação das estirpes por resistotipagem. Porém, o interesse na avaliação da susceptibilidade destas bactérias é cada vez maior nos estudos clínicos e epidemiológicos.

Testes de antibióticos	Sistemas de resistotipagem				
	Lior (1984)	Preston (1984)	API- Campy	Ribeiro et al. (1996)	MAST (1997)
Arsenato de sódio	NT ^a	+ ^b 0.001%	NT	+ 20 µg	+ 30 µg
2,3,5 tri-phenyl tetrazolium de chloride	NT	+ 0.05%	+	+ 600 µg	+ 1000 µg
Metronidazole	NT	+ 5 µg	NT	+ 5 µg	+ 5 µg
5-fluorouracilo	NT	+ 100 µg	NT	+ 60 µg	+ 80 µg
Ácido nalidixico	+ 30 µg	+ 60 µg	+	+ 30 µg	+ 30 µg
Tetraciclina	NT	NT	NT	+ 3 µg	+ 18 µg
Cefalotina	NT	NT	NT	NT	NT
Cefazolina	NT	+ 0.05%	+	NT	NT
Permanganato de potássio	NT	+ 0.1%	NT	NT	NT
Pironina	NT	+ 0.02%	NT	NT	NT
Safranina	NT	+ 0.05%	NT	NT	NT
D-cicloserina	NT	+ 6 mg/l	NT	NT	NT
Eritromicina		NT	+	NT	NT

TABELA 2.1:
Sistemas de resistotipos
habitualmente usados
nas técnicas de
biotipagem

^a "NT" indica que o teste não é utilizado neste sistema. ^b "+" Indica que o teste está incluído neste sistema.

Contudo, a difusão em agar sólido, também utilizada na determinação de CMI's e a difusão em discos são as técnicas mais utilizadas na avaliação das estirpes de *Campylobacter* spp. por resistotipagem.

A resistotipagem, independentemente da técnica utilizada, é um método simples, rápido e economicamente pouco dispendioso. Como todos os métodos fenotípicos, a resistotipagem é capaz de produzir importantes informações associadas às propriedades expressas de *Campylobacter* spp. O método permite tipificar todas as estirpes.

No entanto, ela apresenta alguns problemas relacionados com a sua padronização, pelo que perde reprodutibilidade, tornando difícil comparar resultados inter-laboratoriais.

Entre os factores que influenciam os resultados obtidos através da resistotipagem há que ter em consideração as concentrações de antibióticos, a variabilidade nos meios de cultura, os diluentes e a quantidade de células utilizadas. A aplicação da técnica de difusão em agar é considerada menos dispendiosa que a técnica de difusão em discos, pois permite poupar em dinheiro e tempo para a sua execução.

3. Serotipagem

A serotipagem assenta na capacidade de tolerância térmica dos antígenos flagelares (H), capsulares (K) e somáticos (O) presentes nas bactérias. Assim, os antígenos flagelares, por sua natureza proteica ou polissacarídica, são termolábeis porque o tratamento destes com calor causa tanto a perda da sua especificidade como a sua libertação da célula, enquanto que os antígenos somáticos são termoestáveis, pois a sua natureza mantém-se inalterada após exposição prolongada, de pelo menos 2 horas a temperaturas elevadas (100°C-120°).

Alguns estudos revelaram que existe muita semelhança entre os antígenos termoestáveis das estirpes de *C. jejuni* e *C. coli*, e os das outras bactérias Gram negativas (Penner *et al.*, 1983). O que mais tarde se veio a justificar pela semelhança na composição química dos lipopolissacarídeos das duas espécies de *Campylobacter* e das bactérias entéricas Gram negativas.

Com base nisso, foram desenvolvidos muitos métodos de serotipagem para diferenciar as estirpes de *Campylobacter* spp., baseando-se no modelo usado na identificação das bactérias Gram negativas da família Enterobacteriaceae. Entre estes métodos destacam-se dois que são aceites e que têm sido frequentemente utilizados em muitos laboratórios do mundo inteiro.

O sistema de serotipagem de Penner e Hennessy (1980) tem como alvo os antígenos somáticos (HS) presentes na superfície celular e que se baseia na técnica da hemaglutinação passiva enquanto que o sistema de Lior (Lior *et al.*, 1982) usa os antígenos termolábeis (HL) das células bacterianas, utilizando a técnica de aglutinação bacteriana. Na verdade, ambos os métodos assentam sobre o mesmo princípio de base quanto ao seu funcionamento.

O número elevado de estirpes não tipificadas geralmente obtido, o tempo consumido na execução e as exigências técnicas requeridas constituem as maiores desvantagens destes métodos, além de que os laboratórios não têm sempre disponíveis os reagentes necessários para a serotipagem devido ao custo dos mesmos.

O sistema de Penner é considerado uma técnica poderosa capaz de distinguir as estirpes de *C. jejuni* de *C. coli*. Para alguns autores o número de estirpes não tipificadas pode variar entre 4 e 20% (Gibson *et al.*, 1997; Mills *et al.*, 1991; Jacob-Reitsma *et al.*, 1995; Frost *et al.*, 1998), enquanto que os resultados obtidos Chart *et al.*, (1996) demonstram que estes valores podem atingir 63%.

Mas, apesar dos recentes desenvolvimentos no método de antígenos HS, baseados nas modificações da produção dos anticorpos e nas técnicas de detecção de antígenos, terem trazido melhorias na utilização da serotipagem, este método continua ligado aos problemas relacionados com o número elevado de estirpes não tipificadas, além da disponibilidade restringida dos reagentes (Frost *et al.*, 1998).

4. Fagotipagem

Na técnica de fagotipagem, o primeiro passo assenta no facto de certos vírus como os bacteriófagos utilizarem algumas moléculas tais como as proteínas, glicoproteínas, glicolípidos e os hidratos de carbono presentes na membrana externa das bactérias para se fixar às células bacterianas.

A morte das células bacterianas provocada pela acção lítica destes bacteriófagos traduz-se na produção de placas, sendo a expressão de diferentes estruturas de superfícies destas bactérias determinantes na capacidade infectiva destes vírus, por consequente na definição dos fagotipos.

Embora muitos sistemas de fagotipagem tenham sido desenvolvidos e propostos para a tipificação de estirpes de *Campylobacter* spp., o primeiro e verdadeiro método de fagotipagem para estas bactérias surgiu em 1985, tendo como ponto marcante o uso de caldo de Brucella modificado para o isolamento de fagos em fezes de frangos.

Inicialmente 45 fagos foram isolados, dos quais 14 foram organizados em 4 grupos de três fagotipos e um de 2 fagos. No entanto, a cada reacção de fago foi atribuído um valor numérico. Mas, tendo em consideração o elevado número de estirpes não tipificadas e com o intuito de melhorar a sensibilidade da técnica, foi sugerido o uso de fagos isolados de regiões e ambientes diferentes. Assim, 15 fagos provenientes de lugares diferentes passaram a fazer parte do lote de fagos já definidos por Grajewski *et al.* (1985) para a tipificação de *Campylobacter*.

Contudo, este método revelou-se eficaz em certos casos, na identificação de estirpes isoladas de surtos, distinguindo-as das provenientes de outras fontes. Mas, este exemplo é insuficiente para provar o poder de tipificação que continua reduzido em muitos casos de surtos. Porém, a sensibilidade na tipificação das estirpes pode aumentar, caso o método da fagotipagem for utilizado juntamente com a serotipagem e a biotipagem de Lior.

Em geral, a fagotipagem pode ser útil para a identificação de estirpes isoladas de surtos mas ela deve ser usada em combinação com outros métodos de maior poder de discriminação (Klena, 2001). A fagotipagem é considerada um método estável, pois que os sucessivos actos de congelar e descongelar as estirpes ao longo do tempo não alteram os fagotipos já identificados.

Alguns autores obtiveram resultados concordantes ao utilizarem os métodos de fagotipagem (Salama *et al.*, 1990), biotipagem de Lior (1984) e a serotipagem, quer através de antigénios HS, quer de HL, na identificação das mesmas estirpes de *C. jejuni*. Segundo Frost *et al.* (1999), a fagotipagem discrimina entre isolados do mesmo serotipo.

Os grandes problemas detectados na aplicação dos métodos de fagotipagem prendem-se com a discriminação, tipificação e reprodutibilidade, aos quais se juntam a variabilidade nos meios utilizados, assim como a falta de estabilidade na expressão de antígenos de superfície. Por isso, a fagotipagem não é utilizada em alguns países como a Nova Zelândia (Klena, 2001).

Contrariamente a alguns autores, Jackson *et al.* (1996) consideraram que este método é de um valor epidemiológico limitado mas que com os procedimentos da estrita padronização pode vir a constituir uma boa escolha para a tipificação de *C. jejuni*, embora com uma utilização menos extensiva para *C. coli*.

Além de ter detectado um elevado número de estirpes não tipificadas de *C. jejuni* entre as estirpes isoladas de sangue, Jackson *et al.* (1997) observaram uma correlação aparentemente baixa entre os métodos de fagotipagem, ribotipagem e serotipagem, pois os mesmos fagotipos foram identificados entre diversos ribotipos e sero-grupos.

A fagotipagem de Preston tem sido caracterizada a nível molecular utilizando o PFGE ('pulsed-field gel electrophoresis'), a REA ('restriction enzyme analysis') e a microscopia electrónica (Sails *et al.*, 1998) e os resultados demonstraram que os fagos utilizados não reagem com outras espécies de *Campylobacter* spp. que não sejam *C. jejuni* ou *C. coli*.

Os alvos de fagos são os lipopolissacáridos e as proteínas específicas de estirpes de *C. jejuni* e *C. coli* que são os marcadores celulares da membrana de superfície.

No entanto, sugere-se que a variação antigénica e de fase que se verifica nas moléculas expressas na superfície celular de *C. jejuni* e *C. coli* pode ser a principal causa da baixa reprodutibilidade obtida nalguns trabalhos. Por outro lado, há também a expressão de genes de profago que pode provocar alterações nos antígenos de superfície, e por conseguinte afectar o resistotipo de um determinado organismo (Hanninen *et al.*, 1999).

Apesar das inúmeras desvantagens acima apontadas, a fagotipagem é considerada um método simples e barato de montar e manter, bastando por isso encontrar os fagos necessários e capazes de satisfazer os objectivos. Mas a comparação dos resultados obtidos por fagotipagem entre laboratórios diferentes só tem validade quando é utilizado o mesmo conjunto de fagos.

5. Perfis electroforéticos de proteínas celulares

Quando as bactérias crescem em condições estritamente padronizadas, o conjunto de cerca de 2000 proteínas diferentes produzidas pelo seu genoma mantém-se praticamente invariável, pelo que bactérias estritamente relacionadas deverão apresentar um conteúdo proteico muito semelhante senão proximamente idêntico. Nesta ordem de ideias, os conteúdos proteicos de extractos celulares são analisados por electroforese.

A análise pode também incidir sobre a comparação de proteínas específicas, utilizando a actividade serológica, enzimática e a sequenciação de aminoácidos das mesmas. De facto, as informações variadas obtidas com estas análises constituem uma mais valia para a identificação dos organismos.

A separação electroforética de proteínas celulares totais é realizada em gel de poliacrilamida (PAGE), produzindo bandas individuais que, na maioria dos casos representam diversas proteínas. Porém, apesar de complexos, os perfis obtidos são reprodutíveis e representam “fingerprints” que podem ser comparados para determinadas estirpes.

A aplicação da análise electroforética do conteúdo proteico celular na sistemática bacteriana revelou-se uma ferramenta importante, uma vez que a comparação de perfis electroforéticos estabelece uma medida de confiança da relação genómica, tendo em conta que resultados congruentes são geralmente obtidos entre este método e a hibridação DNA:DNA.

Relativamente ao género *Campylobacter*, um estudo realizado por On, *et al.* (1998) demonstrou que os perfis obtidos na análise proteica geram um poder de discriminação comparável ao que é obtido na hibridação DNA:DNA. No entanto, devido a variabilidade nos perfis proteicos associada à pequenas mudanças nas condições de crescimento, resuspensão e a análise das proteínas, este método não é recomendado para a identificação dos microrganismos a nível infra-específico.

Embora seja considerado um poderoso instrumento para distinguir as estirpes de *Campylobacter* spp. a nível de espécies, a análise proteica é um método pouco usual e de utilização limitada na tipificação das bactérias deste género (Klena, 2001). Ao contrário da fagotipagem, serotipagem, e biotipagem, todas as estirpes submetidas a uma análise proteica são tipificadas. Porém, o método consome muito tempo para a sua execução, facto que é associado à preparação de amostras, ao processo de electroforese e à análise dos perfis.

6. Análise de perfis de ácidos gordos (FAME)

Esta técnica consiste na análise de diferenças entre os ácidos gordos da parede e da membrana celular das estirpes, tendo em consideração o carácter filogeneticamente conservativo da produção destas moléculas. Como acontece com os outros métodos, os perfis obtidos com a análise dos ácidos gordos permitem caracterizar estirpes novas ou desconhecidas comparando-as com as amostras de base de dados previamente caracterizadas (Welch, 1995).

O método permite, graças ao carácter conservador das substâncias em análise, a identificação das estirpes consideradas atípicas no teste de hipurato negativo para *C. jejuni*, que pode ser resolvida com a produção de um perfil correcto da espécie.

A técnica é realizada em cromatografia de gás líquido e a análise é efectuada através de programas informáticos existentes tal como o MIDI (Microbial identification System) que pode ser encontrado no comércio.

Além da sua capacidade de discriminar entre as espécies de *C. fetus* subsp. *fetus* e *C. jejuni* (Blaser *et al.*, 1980a), a análise dos perfis dos ácidos gordos é utilizada para demonstrar que estirpes atípicas que muitas vezes crescem em meios específicos para *Campylobacter* não pertencem a este género (Daneshvar *et al.*, 1998).

Enfim, o método é considerado rápido, simples e gera uma boa discriminação ao nível de espécies e todos os isolados são tipificados. O seu custo é apenas alto na montagem da técnica (Klena, 2001). Mas as condições de cultura e a temperatura utilizadas podem influenciar os resultados obtidos na aplicação desta técnica (Steele *et al.*, 1988).

1.1. INTRODUÇÃO

Como referenciado, os métodos, geralmente utilizados na identificação fenotípica das estirpes de *Campylobacter* spp. apresentam uma capacidade de diferenciação considerada limitada. Por esta razão, na maioria dos laboratórios, a identificação destes organismos restringe-se ao nível do género, pois que a identificação ao nível de espécie e a diferenciação ou tipificação parecem ser pouco fiáveis, pelo que se deve recorrer a métodos moleculares para a confirmação.

Neste trabalho, a identificação e caracterização das 187 estirpes de *Campylobacter* spp. foram feitas pela técnica de biotipagem para a obtenção dos biótipos e pela análise de susceptibilidade das estirpes aos antibióticos para determinar os diferentes perfis ou resistotipos destes isolados. A biotipagem é caracterizada por uma reduzida capacidade discriminatória das estirpes de *Campylobacter* spp. e um baixo poder de tipificação enquanto que o outro tem um elevado poder de diferenciação e todos os isolados submetidos a análise foram tipificados.

1.1.1. Meios de cultura selectivos

O desenvolvimento de meios de cultura selectivos para a detecção de campilobacteres culminou, por parte de alguns investigadores (Dekeyser *et al.*, 1972), no isolamento destes organismos em amostras de fezes humanas, marcando por isso um passo importante no isolamento das bactérias deste grupo assim como na caracterização epidemiológica dos mesmos.

Na verdade, a eficiência demonstrada na selectividade para estirpes de *Campylobacter* spp. deveu-se à suplementação destes meios de cultura com uma combinação de agentes antimicrobianos (TABELA 2.2), capazes de inibir o crescimento de bactérias de outros géneros presentes nas amostras em análise.

Por outro lado, o desenvolvimento destes meios levou alguns investigadores a abdicar do isolamento de campilobacteres por filtração que, até então, era a técnica de eleição para a detecção destas bactérias em amostras de fezes.

Contudo, actualmente, sugere-se a utilização simultânea das duas técnicas, dado que: se os meios selectivos permitem o isolamento rápido e fácil dos campilobacteres eliminando as bactérias contaminantes ou oportunistas das amostras, a técnica de filtração pode levar ao isolamento de novas espécies e resolver o problema da susceptibilidade aos antibióticos.

TABELA. 2.2: Alguns meios selectivos utilizados no isolamento de *Campylobacter* spp.

Meio de:	Base:	Antibióticos:		Desintoxicante:	Referência:
Skirrow	Agar sangue N.º 2 (Oxoid, CM271)	Vancomicina	10 mg/l	Sangue lisado	Skirrow (1977)
		Polimixina B	2500 U.I./l		
		Trimetoprim	5 mg/l		
CAMPY-BAP (Oxoid, CM 169)	Agar Brucella	Vancomicina	10 mg/l	Sangue de carneiro	Blaser <i>et al.</i> (1979)
		Trimetoprim	5 mg/l		
		Polimixina B	2500 U.I./l		
		Anfotericina B	2 mg/l		
		Cefalotina	15 mg/l		
Butzler (Oxoid)	Tioglicolato USP	Bacitracina	25000 U.I./L	Sangue de carneiro	Butzler & Skirrow (1979)
		Colistina	1000 U.I. /L		
		Novobiocina	5 mg/L		
		Cefazolina	15 mg/L		
		Ciclohexamida	50 mg/L		
Preston	Agar nutriente Nova Zelândia	Polimixina B	5000 mg/L	Sangue de cavalo	Bolton & Robertson (1982)
		Rifampicina	10 mg/L		
		Trimetoprim	10 mg/l		
		Ciclohexamida	100 mg/L		
Butzler (Virion I) (Oxoid 331)	Agar columbia	Colistina	10000 U.I. /L	Sangue de carneiro	Goossens <i>et al.</i> (1983b)
		Rifampicina	10 mg/L		
		Cefaperazona	15 mg/L		
		Anfotericina B	2 mg/L		
Butzler (Virion II)		Rifampicina	10 mg/L	Sangue de cavalo	Goossens, H (1986)
		Cefaperazona	30 mg/L		
		Anfotericina B	2 mg/L		
C.C.D.A.	Agar selectivo	Cefaperazona	32 mg/L	Carvão, Sulfato ferroso e Piruvato de sódio	Hutchinson & Bolton (1983)

A identificação fenotípica das estirpes de *Campylobacter* spp. pode ser feita por determinação de biótipos (método de biotipagem), serovares (serotipagem), fagotipos (fagotipagem) e perfis de susceptibilidade a antibióticos (resistotipagem),

A maior dificuldade na determinação das taxas de prevalência para certas espécies de *Campylobacter* deve-se ao facto de não existirem métodos com critérios específicos para a identificação de cada uma das espécies deste género.

Como se sabe os métodos, geralmente utilizados foram concebidos para a identificação de *Campylobacter jejuni* e, muitas experiências têm demonstrado que nem todos estes métodos são óptimos para a identificação de estirpes pertencentes a outras espécies deste género.

A biotipagem, apesar de alguns problemas¹, tornou-se numa ferramenta indispensável para a identificação presuntiva de campilobacteres enquanto que técnicas como a serotipagem quer com antigénios termo-estáveis, quer com antigénios termo-lábeis e o método de fagotipagem são amplamente utilizados em alguns laboratórios como métodos de vigilância epidemiológica e clínica em muitos países. Mas, apesar da sua importância, cada um destes métodos apresenta alguns problemas, nomeadamente, o elevado custo para a sua execução, o baixo grau de discriminação, e a falta de capacidade de tipificação para algumas estirpes que constituem limitações para a sua utilização.

1.1.2. Identificação e determinação dos biótipos

A utilização de escassas provas bioquímicas na identificação das estirpes de *Campylobacter* spp. deve-se a inércia verificada nas bactérias deste género quanto a utilização de hidratos de carbono e a maioria de outras reacções bioquímicas.

Este facto pesou muito negativamente para a elaboração de métodos que possam facilitar a identificação e/ou a tipificação das estirpes deste género.

No entanto, o desenvolvimento do método para a determinação dos biótipos de *Campylobacter* spp. assumiu, ao longo de alguns anos, várias contornos baseados principalmente em poucos testes que hoje se resumem basicamente em 3 provas bioquímicas, nomeadamente: a hidrólise de hipurato de sódio, a hidrólise de DNA em meio contendo azul de toluidina agar-DNN, e a produção rápida de ácido sulfídrico em meio com FBP (0.2 % de agar purificado contendo metabisulfito de sódio, piruvato de sódio e sulfato de ferro (7H₂O).

Estas provas bioquímicas permitem separar as estirpes mais frequentemente isoladas de campilobacteres termófilos em espécies, e estas por sua vez em respectivos biótipos como se pode observar na Tabela 2.3 (Lior, 1984).

Em 1980, Skirrow e Benjamim propuseram a primeira caracterização bioquímica das estirpes de *Campylobacter* spp. baseando-se na capacidade destes organismos produzir ácido sulfídrico, hidrolisar o hipurato de sódio e na análise de perfis de sensibilidade ao ácido nalidíxico.

¹ A prova bioquímica de hidrólise de hipurato de sódio pode produzir falsos positivos.

Biótipos	<i>C. jejuni</i>				<i>C. coli</i>		<i>C. lari</i>	
	I	II	III	IV	I	II	I	II
Hidrólise de hipurato	+	+	+	+	-	-	-	-
Hidrólise de DNA	-	+	-	+	-	+	-	+
Produção rápida de H ₂ S	-	-	+	+	-	-	+	+

TABELA.2.3: Biótipos de estirpes termófilas enteropatógenicas de *Campylobacter* spp. (Lior, 1984).

O método de biotipagem proposto, demonstrou ter uma capacidade de detectar 4 biótipos de *C. jejuni* e, apenas dois em cada uma das duas espécies restantes: *C. coli* e *C. lari*, sendo este último então denominado NARTC (Nalidixic Acid-Resistant Thermophilic *Campylobacter*).

Dois anos mais tarde, o método proposto por Hébert *et al.* (1982) modificou o teste usando outras substâncias químicas como fonte de carbono e substituiu o teste de sensibilidade ao ácido nalidíxico pela capacidade destas bactérias crescerem em meio contendo extracto de levedura e carvão.

Com estas alterações, o método produziu também um total de 8 biótipos para as três espécies de *Campylobacter*, sem no entanto apresentar capacidade para a identificação de espécies.

A diferenciação das estirpes de *C. jejuni* e *C. coli* obtida pelo teste de hidrólise de hipurato descrito por Skirrow & Benjamim (1980a) foi validada pelos estudos de alguns autores como Harvey & Greenwood (1983) e Ursing *et al.* (1983), enquanto que o teste de produção rápida de ácido sulfídrico, cuja natureza da enzima responsável pelo enegrecimento do meio de cultura utilizado não era ainda conhecida, apresentava uma baixa reprodutibilidade nos resultados obtidos por depender da idade dos meios de cultura e e/ou do tempo de incubação (Lior, 1984).

Mas estas limitações da técnica foram ultrapassadas, utilizando meios de cultura esterilizados com pelo menos 24 horas e trabalhando com estirpes recentes isoladas ou provenientes de culturas congeladas ou liofilizadas cuja recuperação deve ser feita em pelo menos cinco repicagens antes do teste.

Na tentativa de se obter uma melhor caracterização das estirpes que permita alcançar um grau superior de discriminação, quer a nível de espécies, quer a nível de biótipos, muitas versões do método surgiram, incluindo a de Lior (1984) que é preferencialmente usada.

É assim que uma equipa de investigadores, aproveitando a capacidade dessas bactérias crescerem em meio de cultura contendo prolina, leucina, niacina, ácidos glutâmico e aspártico como únicas fontes de carbono, conseguiu separar as estirpes enteropatogénicas de *Campylobacter* spp. com base em provas bioquímicas tais como a hidrólise de hipurato e a actividade fosfatásica (Roop *et al.*, 1984).

No entanto, este método continuava a produzir um número reduzido (4) de biótipos para cada uma das duas espécies de *Campylobacter* clinicamente consideradas como as mais importantes na gastroenterite humana (*C. coli* e *C. jejuni*).

O método de biotipagem dos campilobacteres actualmente utilizado, além de não poder ser aplicado a outras espécies não termofílicas, tem-se revelado pouco discriminatório, produzindo apenas quatro biótipos para a espécie *C. jejuni*, dois para *C. coli* e dois para *C. lari*.

Apesar disso, este método constitui uma das ferramentas mais importantes senão essenciais na identificação e tipificação presuntivas dos organismos deste grupo, uma vez que apresenta, como vantagens, a capacidade de identificação e diferenciação das estirpes a nível de espécie, a simplicidade da técnica, o baixo custo e o período reduzido de tempo necessário para a sua execução.

A sua contribuição é ainda maior quando utilizado em simultâneo com outros métodos, quer fenotípicos (serotipagem, fagotipagem, sensibilidade aos antibióticos), quer moleculares (baseados na técnica de PCR – ‘Polymerase Chain Reaction’).

A utilização deste método em paralelo com a serotipagem pode permitir a obtenção de uma maior capacidade de tipificação para estas bactérias. Por outro lado, a identificação das estirpes pertencentes não apenas ao mesmo sero-grupo mas também ao mesmo biótipo pode ser relevante do ponto de vista clínico.

Sabe-se que a informação veiculada pela técnica de biotipagem é limitada mas os diferentes grupos (espécies e biótipos) obtidos na tipificação das bactérias termofílicas do género *Campylobacter* podem ser usados como marcadores epidemiológicos.

Por esta razão, a utilização de biotipagem como método adicional, nomeadamente à serotipagem, torna-se numa fonte de informação acrescida no estudo de mecanismos de transmissão e de patogenicidade destas bactérias nos surtos em humanos e animais (Lior, 1984).

1.2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

1.2.1. Colheita e tratamento das amostras

As estirpes analisadas neste trabalho foram isoladas de 220 amostras de fezes de frangos das quais cento e vinte (54,5%; 120/220) são provenientes de aviários situados nos arredores de Lisboa (Portugal) e as restantes cem (45,5%; 100/220) de aviários situados nos arredores da cidade de Luanda(Angola).

A colheita foi realizada, introduzindo uma zaragatoa no orifício anal das aves vivas (frangos) e imprimindo movimentos giratórios e de vai e vem. A seguir, a zaragatoa foi guardada num tubo de ensaio contendo o meio de cultura apropriado para o transporte (Carry Blair). O tempo de espera até ao seu processamento em laboratório não ultrapassou um período de tempo superior a duas horas.

1.2.2. Isolamento das estirpes

No isolamento das estirpes foi utilizado o meio selectivo Columbia Agar Base (Oxoid CM 331) ao qual foram adicionados 5% de sangue de cavalo lisado e desfibrinado, assim como um suplemento de antibiótico (SR 7).

A sementeira das amostras foi efectuada pelo método de esgotamento por estrias em placa de Petri, e a incubação foi realizada em condições de microaerofilia, ou seja 5% de oxigénio (O₂), 10% de dióxido de carbono (CO₂) e 85% de azoto (N₂), por um sistema gerador de gás com catalisador (OXOID BR. 56) em jarra de anaerobiose, por um período de 24 e/ou 48 horas.

As placas que apresentavam um crescimento característico das bactérias em estudo foram seleccionadas e a partir destas foram feitas repicagens sucessivas até a obtenção de culturas puras, que posteriormente foram utilizadas para efectuar uma caracterização preliminar das estirpes, utilizando as seguintes provas: observação microscópica, provas de catalase e oxidase. As culturas bacterianas consideradas puras foram conservadas a -70°C em meio de "Tryptone Soya Broth " com 18% de glicerol.

1.2.3. Determinação dos biótipos de *Campylobacter*

Como já foi referido, a caracterização preliminar dos isolados foi realizada por observação microscópica das culturas previamente seleccionadas e coradas pela técnica de Gram.

As estirpes com as células Gram negativas dotadas de uma citomorfologia em bastonetes espiralados ou encurvados foram submetidas às provas de catalase e oxidase, utilizando a água oxigenada a 10 volumes e a solução aquosa a 1% de oxalato de *p*-aminodimetilanilina (Difco), respectivamente.

Assim as bactérias com os resultados positivos nas provas de catalase e oxidase foram consideradas pertencentes ao grupo de organismos do género bacteriano em estudo.

Para a identificação ao nível de espécie e a determinação dos biótipos, foi utilizado o esquema proposto por Lior (1984) que determina 8 biótipos, baseando-se essencialmente e como já se referiu, em 3 provas bioquímicas que são: hidrólise de hipurato, hidrólise de DNA e produção rápida de ácido sulfídrico.

1. Prova de hidrólise de hipurato

Para esta prova, foi preparada uma suspensão de células bacterianas em 0,4 ml de uma solução aquosa de hipurato de sódio (Sigma) a 1% numa concentração equivalente a 1 na escala de Mc Farland. As suspensões assim preparadas foram incubadas em banho a 37°C, durante 2 horas.

De seguida foram adicionados, sem agitar, 0,2 ml de uma solução de ninidrina (Merck) a 3,5% numa solução de 1:1 de butanol (Merck) e acetona (Merck), sendo a incubação efectuada em banho, a 37°C durante 10 minutos. A hidrólise de hipurato é revelada através do aparecimento de uma coloração azul característica da suspensão. Uma suspensão de cultura com coloração pálida ou ausência total de coloração foi considerada negativa.

2. Prova de produção rápida de ácido sulfídrico

Com uma ansa de meio calibre (33 mm de diâmetro), foi retirada uma quantidade padronizada de cultura com apenas 24 horas em meio Müller Hinton com 5% de sangue lisado e desfibrinado, que seguidamente foi inoculada em meio de Brucela Broth contendo 0,2% de agar purificado, metabissulfito de sódio, piruvato de sódio e sulfato de ferro heptahidratado, introduzindo a ansa até meio do tubo.

Os tubos foram incubados em banho a 37° C durante 2 horas. Ao fim deste tempo, as estirpes produtoras de ácido sulfídrico apresentavam um enegrecimento do inóculo e foram consideradas positivas.

3. Prova de hidrólise de DNA

Para realização desta prova, uma ansada de uma cultura bacteriana recente em Müller Hinton com 5% de sangue de cavalo foi inoculada em meio contendo DNA (Difco) e azul de toluidina “O” (Sigma).

A incubação foi feita a 37° C durante 48 e 72 horas, em condições de microaerofilia como referenciado. A formação de um halo incolor ou rosado em torno do inóculo revela um resultado positivo correspondente à hidrólise do DNA.

1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.3.1. Prevalência de isolamento das estirpes

No isolamento das estirpes *Campylobacter* spp. foi registada uma taxa de 100% em 220 amostras analisadas, sendo 120 de Portugal e 100 de Angola, respectivamente. Destas estirpes, apenas 187 foram submetidas à análise que se propôs neste trabalho. Das restantes 33 estirpes, exclusivamente isoladas das amostras de frangos angolanos, 13 não resistiram às condições pouco estáveis de incubação devidas a cortes de energia eléctrica que constantemente se registaram na cidade de Luanda, enquanto que 20 foram perdidas no transporte dos isolados de Angola para Portugal.

Analizando este resultado, pode dizer-se que a taxa de isolamento das estirpes de campilobacteres obtida confirma a importância dos frangos como principal reservatório de estirpes de *Campylobacter* spp. enteropatogénicas.

Assim, as elevadas taxas de isolamento obtidas em amostras de fezes de frangos neste estudo não só estão de acordo com os resultados de muitos investigadores que trabalham com este tipo de amostras, como também sugerem a importância significativa deste reservatório na prevalência das infecções assintomáticas. Por outro lado, estes resultados foram superiores às taxas de isolamento relatados por Cabrita *et al.* (1985) em Portugal, noutros países da Europa e nos Estados Unidos de América, enquanto Gomes *et al.* (1996) obtiveram, ainda em Portugal, um resultado idêntico ao alcançado nesta pesquisa.

1.3.2. Espécies e biótipos identificados pelo método de Lior (1984)

A aplicação dos testes de biotipagem de Lior (1984) às 187 estirpes de *Campylobacter* spp. permitiu identificar 111 como *C. jejuni* e 76 como *C. coli*, não tendo sido encontrada nenhuma estirpe pertencente a espécie *C. lari* em nenhuma das amostras analisadas. A distribuição por biótipos identificados apresenta-se na TABELA 2.4, para *C. jejuni*, e na TABELA 2.5, para *C. coli*.

Verifica-se que a proporção de estirpes de *C. jejuni* foi mais elevada em Portugal (89,2%) que em Angola (10,8%), onde a predominância de *C. coli* foi notória, confirmando a opinião de muitos autores que sugerem a predominância de *C. jejuni* nos países desenvolvidos e *C. coli* nas nações com pouco desenvolvimento sócio-económico.

No entanto, segundo alguns investigadores, os valores discordantes da prevalência que muitas vezes se registam entre as espécies *C. jejuni* e *C. coli* podem dever-se ao tipo de reservatório (fonte) a que esteve exposto o hospedeiro e/ou pelo comportamento de cada uma destas espécies em relação a determinados antibióticos, tais como a colicistina, cuja utilização em meio de cultura constitui um factor de inibição das estirpes de *C. coli*.

As estirpes de *C. jejuni* I e *C. jejuni* II com as taxas de isolamento de 94,9% (94/99) e 83,3% (10/12) constituem os biótipos mais isolados em Portugal e Angola, respectivamente

Quanto ao biotipo III desta espécie, as estirpes deste grupo infra-específico foram as menos isoladas de todos os biótipos em ambas as origens.

Repare-se que entre as amostras de Angola (TABELA 2.4) não foi isolada nenhuma estirpe de *C. jejuni* pertencente ao biótipo III enquanto que o mesmo biótipo foi isolado em 2% de amostras de Portugal.

Numa análise global das amostras provenientes de ambas origens, as estirpes pertencentes ao biótipo I da espécie *C. jejuni*, foram as mais isoladas, correspondendo a 86,5% (96/111) dos isolados.

Origem	<i>C. jejuni</i> I	<i>C. jejuni</i> II	<i>C. jejuni</i> III	Σ
Angola	16.66%	83.33%	0.00%	10.81%
	(2/12)	(10/12)	(0/12)	(12/111)
Portugal	94.94%	3.03%	2.02%	89.18%
	(94/99)	(3/99)	(2/99)	(99/111)
			Total	100%

TABELA 2.4:
Distribuição dos biótipos de *C. jejuni* segundo a origem dos isolados

Na TABELA 2.5 pode observar-se que nas amostras de Angola, o biotipo I foi o mais isolado, correspondendo a 72,4% (55/76) das estirpes de *C. coli*, seguido do biótipo II com apenas 10,9% (6/55) das estirpes desta espécie.

Com as amostras de Portugal, não foi identificada nenhuma estirpe de *C. coli* pertencente ao biotipo II.

A predominância do biótipo I de *C. coli* verifica-se ainda quando se considera a totalidade de isolamentos de ambas as origens. Assim, 92,1% (70/76) das estirpes de *C. coli* foram identificadas como sendo do biotipo I.

Origem	<i>C. coli</i> I	<i>C. coli</i> II	Σ
Angola	89.09%	10.90%	72.36%
	(49/55)	(6/55)	(55/76)
Portugal	100%	0.00%	27.63%
	(21/21)	(0/21)	(21/76)
		Total;	100% (76/76)

TABELA 2.5:

Distribuição dos biótipos de *C. coli* segundo a origem dos isolados.

A biotipagem, como já foi referido, é a uma das técnicas utilizadas na identificação das estirpes termófilas de *Campylobacter* spp. ao nível de espécie e na determinação dos seus biotipos respectivos. No entanto, este método permite apenas a identificação de 3 espécies e 8 biotipos entre todas as espécies pertencentes a este género bacteriano. O que demonstra a reduzida capacidade de diferenciação que este método apresenta, pese embora o seu importante significado na clínica e nas análises epidemiológicas do grupo termófilo enteropatogénico dos campilobacteres, pois este método tem se revelado importante na identificação dos isolados (espécies ou biotipos) e no estabelecimento de correlações com possíveis fontes de contaminação (diferentes reservatórios).

2.1. INTRODUÇÃO

Os perfis de sensibilidade a antibióticos de estirpes bacterianas são padrões definidos de acordo com o comportamento de uma estirpe ou grupos de estirpes perante um conjunto seleccionado de antibióticos. Esses padrões, ao determinar o comportamento de estirpes, tornam-se num instrumento indispensável para os estudos de avaliação e caracterização clínicas e epidemiológicas destas estirpes.

A resistência aos antibióticos baseia-se normalmente na resistência intrínseca, caracterizada por propriedades inerentes de estirpes de uma espécie ou género bacteriano, a um determinado antibiótico ou na resistência adquirida que através de um processo de mutação cromossómica e/ou de elementos de ácidos nucleicos extra-genómicos como os plasmídeos e transposões.

As mutações cromossómicas conferem modificações que podem ser mais ou menos importantes, levando a cabo alterações estruturais. Primeiro, ao nível do próprio cromossoma por modificação parcial ou total de informação genética da espécie ou estirpe, e por consequente interferindo no comportamento parcial ou total destes organismos, devido às consequentes alterações que se verificam ao nível de algumas estruturas celulares.

Sabe-se que as estirpes de *C. jejuni* e *C. coli* são inerentemente resistentes a bacitracina, novobiocina, rifampicina, estreptogramina B, trimetoprim, vancomicina, assim como habitualmente à cefalotina (Burridge *et al.*, 1986). Para alguns antibióticos, a sua incapacidade de penetração na célula é considerada como um provável mecanismo intrínseco de resistência (Taylor & Courvalin, 1988).

Considerando este facto, Butzler & Skirrow (1979) usaram combinações destes antibióticos para a elaboração de meios de cultura para o isolamento selectivo deste grupo de bactérias, como já referido (TABELA 2.2).

Sabe-se também que a resistência adquirida através da transferência de genes mediada por transposões ou plasmídeos permite-nos encontrar estirpes de espécies diferentes que partilham o mesmo habitat, e que apresentam resistência ao mesmo antibiótico, sugerindo uma possível transmissão horizontal de genes de resistência entre espécies. Importa também lembrar que a aquisição de resistência aos antibióticos pode muitas vezes ser o resultado de uma exposição intensa das estirpes aos agentes antimicrobianos.

Em ambientes como os hospitais verifica-se, além de um elevado grau de emergência de estirpes resistentes, um aumento considerável de estirpes portadoras de plasmídeos.

A utilização de antibióticos como substâncias profiláticas ou ainda como suplementos de crescimento na área de produção animal contribui de forma muito decisiva para o aumento da prevalência de estirpes resistentes portadoras de plasmídeos e/ou transposões. No caso das quinolonas, o uso desta prática em muitos países europeus e nos Estados Unidos da América teve um papel fundamental na emergência e aumento de estirpes resistentes.

Mas apesar de haver uma maior prevalência de estirpes resistentes nos animais que nos humanos, a transmissão destas estirpes dos animais para os humanos aquando das infecções zoonóticas ou das intoxicações alimentares permite o aumento de prevalência de estirpes resistentes aos antibióticos nos humanos.

No entanto não se deve negligenciar o papel das quimioterapias, geralmente usadas nos casos de doentes imunocomprometidos tais como os infectados com o vírus de HIV e nas suspeitas de infecções extra-intestinais nas quais o seu uso é muitas vezes indispensável.

A detecção de plasmídeos idênticos em microrganismos isolados a partir de amostras de origem humana e animal constitui mais uma prova da transmissão horizontal destes elementos genéticos extra-cromossómicos entre as estirpes portadoras.

Em certos países como os Estados Unidos, metade da produção farmacêutica de antibióticos destina-se ao tratamento das infecções quer dos humanos quer dos animais enquanto que a outra metade é utilizada como suplemento alimentar para o crescimento animal.

Só uma política racional e um controlo adequado e regular do uso de antibióticos, quer em clínica humana e veterinária ou na indústria, pode garantir a eficácia destes e evitar a emergência e o aumento do número de estirpes resistentes. No entanto a experiência demonstra que para cada nova terapêutica introduzida no mercado pela indústria farmacêutica regista-se uma resposta bacteriana correspondente a um novo mecanismo de resistência.

2.1.1. Quinolonas

As quinolonas actuam sobre a enzima DNA girase. Esta enzima constitui de facto o principal alvo de actuação dos antibióticos desta família, provocando a inibição do processo de replicação.

No entanto, sabe-se que a proteína DNA girase A (*gyrA*) é fundamental na replicação do DNA, sendo responsável pela manutenção do super-enrolamento negativo que se observa na molécula do DNA .

A resistência a fluoroquinolonas está relacionada com a selecção de estirpes mutantes que impedem a inibição da replicação do DNA e/ou que permitem a alteração da permeabilidade da membrana bacteriana, um outro mecanismo de resistência bacteriana a estes antibióticos.

O mecanismo de resistência das estirpes de *Campylobacter* spp. a esta família de antibióticos consiste na incapacidade de penetração destes agentes antimicrobianos na célula bacteriana ou na inibição da sua actividade sobre a sub-unidade A da DNA girase.

Este é um dos mecanismos de resistência às fluoroquinolonas mais conhecidos, e que é geralmente encontrado nas estirpes de *Campylobacter* spp., e consiste na mutação de substituição do aminoácido isoleucina por treonina, no codão 86 (ACA-ATA) do gene *gyrA* (Gaunt & Piddock, 1996; Husmann *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1993).

Embora dotados de diferentes tipos de mecanismos de resistência, de acordo com Endtz *et al.* (1991) uma influência ambiental pode estar na origem do aparecimento de resistência nas estirpes de *Campylobacter* spp. às diferentes fluoroquinolonas. Este facto é particularmente devido, como já foi referido, ao uso extensivo e abusivo dos antibióticos desta classe na medicina humana e na veterinária, justificaram os autores.

Mas a aquisição de resistência às fluoroquinolonas por parte de algumas estirpes de *Campylobacter* spp. pode ser explicada pelo facto destas estirpes possuir intrinsecamente um certo nível de resistência a estes antibióticos devido à presença de uma bomba de efluxo, e que o aparecimento de mutação *gyrA* (Charvalos *et al.*, 1995) pode levar a um fenómeno de resistência completa.

As fluoroquinolonas tais como a ciprofloxacina, a norfloxacina e a ofloxacina eram considerados antibióticos eficazes contra as estirpes de *C. jejuni* e *C. coli* (Goossens *et al.*, 1985), sendo muitas vezes considerados agentes antimicrobianos de escolha para o tratamento da campilobacteriose.

Geralmente considerados antibióticos de largo espectro, as quinolonas podem ser usadas como alternativas a muitos outros antibióticos tais como as penicilinas e cefalotinas no tratamento de infecções por bactérias produtoras de β -lactamases, assim como nas bactérias multi-resistentes.

Mas por se verificar, a partir da década passada, uma considerável emergência e um elevado aumento de estirpes de *Campylobacter* spp. resistentes (30-35%), estes antibióticos passaram a ser substituídos por eritromicina no tratamento de crianças e adultos com esta infecção.

A introdução de fármacos desta família de antibióticos na medicina veterinária para fins profilácticos e/ou como suplemento alimentar, em varios países da Europa e nos Estados Unidos da América (TABELA 2.6), teve um papel relevante na emergência e aumento de estirpes resistentes.

País	Substância	Ano	Animais	Referência	TABELA 2.6: Algumas datas de autorização de uso de fluoroquinolonas na veterinária em alguns países
Dinamarca	Enrofloxacina	1991	Frango, porco,	a ¹	
	Danofloxacina	1993	Frango		
	Difloxacina	1998	Frango, Peru		
	Morbofloxacin	1998	Gado, porco,		
Itália	Enrofloxacina	1989	Gado, porco,	a ¹	
	Difloxacina	1998	Frango		
	Enrofloxacina	1991	Gado, frango		
França	Danofloxacina	1996	Gado	a ¹	
	Morbofloxacin	1993	Gado		
	Difloxacina	1998	Frango		
Espanha	Enrofloxacina	1986	Gado, porco,	a ¹	
	Difloxacina	1998	Frango		
Holanda	Enrofloxacina	1987	Gado, porco,	a ¹	
	Difloxacina	1998	Frango		
G.Bretanha	Enrofloxacina	1993	Gado, porco,	a ¹	
	Danofloxacina	1993	Frango		
	Morbofloxacin	1995	Gado		
	Difloxacina	1998	Frango		
Estados Unidos	Enrofloxacina	± 1987- 88	Cães, gatos	Watts, 1999	
		1996	Frango		
	Sarafloxacina	1999	Gado		
		1995	Frango		
Portugal	Ciprofloxacina	1993	Frango	Gomes <i>et al.</i> , 1996	

O uso de enrofloxacin, a partir de 1985, na profilaxia veterinária das doenças diarreicas causadas por microrganismos como *Mycoplasma* em frango, contribuiu significativamente para o aparecimento e aumento progressivo da prevalência de estirpes de *Campylobacter* spp. resistentes às quinolonas. Na verdade, sabe-se que até aquele ano não era registado nenhum caso de resistência às quinolonas entre as estirpes deste grupo bacteriano.

Alguns autores (Endtz, *et al.*, 1991), fazendo referência aos estudos realizados até aquele ano e que foram relacionados com a resistência de *Campylobacter* às fluoroquinolonas, revelaram uma ausência de resistência entre estirpes de diferentes fontes pesquisadas, nomeadamente fezes humanas e produtos avícolas. No entanto, os 3 primeiros casos de isolamento de estirpes de *Campylobacter jejuni* resistentes a estes antibióticos na Espanha remontam a 1988 (Reina *et al.*, 1994).

¹ The European Agency for Evaluation of Medical Products, 1999, Cit por Engberg *et al.*, 2001.

Só a partir daquele ano é que começou a verificar-se um aumento progressivo das taxas de resistência às quinolonas nas estirpes de *Campylobacter* spp. isoladas nos humanos naquele país, tendo sido registados 3 a 8% e 19 a 50% em 1989 e 1991, respectivamente (Mirelis *et al.*, 1993; Moles *et al.*, 1992; Sánchez *et al.*, 1994). A mesma tendência foi observada em alguns países da Europa, como a Holanda (Endtz *et al.*, 1991), a Grã-Bretanha (Bowler & Day, 1992; Gaunt & Piddock, 1996), e a Finlândia (Rautelin *et al.*, 1991), enquanto noutros países como a Suécia (Olsson-Liljequist & Mollby, 1990; Sjögren *et al.*, 1992), Estados Unidos (Nachamkin, 1994) e Áustria (Hirschl *et al.*, 1990), registavam-se ainda valores inferiores.

Na Holanda, a enrofloxacin e a ciprofloxacina, quinolonas da terceira geração, foram introduzidas na medicina humana e veterinária em 1987 e 1988, respectivamente, sendo a enrofloxacin frequentemente usada na criação de frangos com objectivo de reduzir os problemas da vacinação na primeira semana de vida ou no combate a infecções respiratórias provocadas por *Escherichia coli*, a partir da terceira ou quarta semana (Jacobs-Reitsma *et al.*, 1994).

C. jejuni e *C. coli* são habitualmente considerados susceptíveis ao ácido nalidíxico (Karmali *et al.*, 1981), uma quinolona da primeira geração com qual estão quimicamente relacionadas as fluoroquinolonas. Mas, é muitas vezes possível seleccionar algumas estirpes mutantes resistentes a esta droga, sendo no entanto todas as estirpes das outras espécies como *C. lari*, *C. fetus* subsp. *fetus*, *C. fetus* subsp. *venerealis* e *C. hyointestinalis*, intrinsecamente resistentes ao ácido nalidíxico (Taylor *et al.* 1985). Alguns investigadores como Sáenz *et al.* (2000) relataram a existência de uma resistência cruzada entre a ciprofloxacina e o ácido nalidíxico nas estirpes de *Campylobacter* spp..

Num estudo realizado por Reina *et al.* (1995), foi observada uma ocorrência de resistência cruzada, pois os autores verificaram que estirpes resistentes a quinolonas demonstraram também ser resistentes aos macrólidos.

A correlação existente entre o uso das quinolonas, particularmente a enrofloxacin na medicina veterinária e o aumento de resistência de estirpes de *Campylobacter* spp. à ciprofloxacina como já tem sido demonstrado em vários países da Europa (Mirelis *et al.*, 1993; Piddock, 1995), foi claramente confirmado no estudo de Sáenz *et al.* (2000).

2.1.2. Macrólidos

O mecanismo de acção antimicrobiana desta classe de antibióticos actua ao nível dos ribossomas, provocando a inibição da síntese de proteínas após a sua ligação à sub-unidade 50S. Tem-se registado, nos últimos anos, um aumento considerável de estirpes resistentes.

Nas bactérias Gram negativas, a resistência à eritromicina deve-se a impermeabilidade da parede celular destas bactérias a este antibiótico, sendo por esta razão, uma resistência intrínseca, excepto em alguns casos de estirpes mutantes com modificações na parede celular. Nestas bactérias, os registos de maior importância clínica neste grupo de bactérias em relação à eritromicina estão relacionados com a resistência mediada por plasmídeos e transposões, apesar de também se observar resistência de origem cromossomal. Neste caso, a enzima responsável pelo fenótipo de resistência e que se encontra normalmente reprimido nas bactérias selvagens (sensíveis) pode ser induzido provocando a metilação de adenina no rRNA 23S.

Existem também estudos que demonstram que a resistência à eritromicina observada nas estirpes de *Campylobacter coli* não está relacionada só com a presença de DNA plasmídico (Taylor, 1984), podendo por isso, a resistência aos macrólidos ser muitas vezes determinada a nível de cromossómico neste grupo bacteriano.

Em algumas estirpes de *C. jejuni* e *C. coli*, foi também encontrada uma resistência cruzada entre a eritromicina e outros antibióticos desta classe, nomeadamente a espiramicina, tilosina, e clindamicina (Burridge *et al.*, 1986; Karmali *et al.*, 1981), sabendo-se que as estirpes de *C. jejuni* e *C. coli* são intrinsecamente resistentes à estreptogramina B.

Segundo os resultados dos trabalhos de alguns investigadores (Brunton *et al.* 1978; Taylor *et al.* 1986), a prevalência da resistência de campilobacteres termófilos à eritromicina varia amplamente de acordo com a área geográfica envolvida no estudo, sendo que nos países desenvolvidos os números podem situar-se entre 1 e 10%.

O uso indiscriminado de outros macrólidos como a tilosina na criação de suínos tem proporcionado um aumento da prevalência de estirpes resistentes à eritromicina, pois Reina *et al.* (1994), num estudo efectuado entre 1987 e 1993, referem que as estirpes de *Campylobacter coli* são muito mais resistentes a este agente antimicrobiano que as da espécie *Campylobacter jejuni*. O que já havia sido observado por outros investigadores (Wang *et al.* 1984; Burridge *et al.* 1986; Sagara *et al.* 1987; Taylor *et al.* 1987).

E, na Grã-Bretanha, a resistência aos macrólidos parece largamente distribuída entre as estirpes de *C. coli* de origem suína. Este facto foi associado ao uso frequente de alguns antibióticos, nomeadamente a tilosina e a virginiamicina como suplemento de crescimento na veterinária (Burridge *et al.* 1986).

Entre 1978 e 1986, na Grã-Bretanha (Brunton *et al.*, 1978) e no Canadá, (Taylor *et al.*, 1986), foram registadas apenas cerca de 1% de estirpes de *Campylobacter* spp. resistentes à eritromicina. No entanto, importa considerar que a existência de um grande reservatório animal de estirpes de *C. coli* resistentes nalguns países como a Tailândia pode tornar-se um problema no tratamento das infecções destes microrganismos (Taylor *et al.*, 1987).

Deste modo, pode ocorrer a selecção e a indução de resistência aos antibióticos tanto para eritromicina como para outros macrólidos (Reina, 1993; Reina *et al.*, 1995).

Mas ao que tudo indica, apesar do aumento da prevalência registado nos últimos anos, a eritromicina continua ainda a ser o antibiótico de eleição para o tratamento de campilobacteriose em muitos países.

2.1.3. Tetraciclinas

Os antibióticos desta família são bacterioestáticos de largo espectro de actividade antimicrobiana cujo mecanismo de acção é a inibição da síntese proteica, bloqueando a ligação aminoacil-tRNA ao complexo mRNA-ribossoma. A ligação dos antibióticos desta família à sub-unidade ribossomal 30S traduz-se pela inibição da síntese de proteínas.

Estes fármacos podem ser utilizados no tratamento das infecções causadas por um grande número de bactérias que inclui Gram positivas, Gram negativas, aeróbias e anaeróbias, assim como *Mycoplasma*, *Chlamydia* e *Rickettsia* (Levy, 1988; Chopra *et al.* 1992; Freeman *et al.* 1994)

A sua penetração na célula bacteriana requer energia apenas ao nível da membrana citoplasmática, sendo a sua passagem pela parede celular facilitada por difusão passiva. No entanto, nas bactérias resistentes a estes antibióticos verificam-se alterações em ambas as fases de penetração (parede e membrana).

Além da resistência mediada pelo cromossoma, diversos genes plasmídicos codificando para uma resistência indutiva foram identificados em diversos grupos de bactérias. Entre estes destacam-se os seguintes: *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, e *tetE*, maioritariamente encontrados nas bactérias Gram negativas, e *tetK*, *tetL*, *tetM*, *tetN*, e *tetO* presentes em bactérias Gram positivas.

Na verdade, sabe-se que mais de dezasseis genes *tet* conferem resistência, codificando quer para uma proteína de efluxo que bombeia a tetraciclina para fora da célula bacteriana, quer para uma proteína ribossomal de protecção.

Segundo Burdet (1986), *tetO* actua provavelmente ao nível de síntese de proteínas nas estirpes de *Campylobacter* spp como similarmente acontece com *tetM* nas outras bactérias.

A resistência cruzada entre a tetraciclina e ciprofloxacina deve-se, como explicaram Velásquez *et al.* (1995), à presença simultânea de mecanismos de resistência mediada por plasmídeos e bomba de efluxo.

A tetraciclina é um dos antibióticos extensamente utilizados para o tratamento das infecções de tractos respiratório e urogenital dos humanos, assim como outras doenças tais como as doenças de “Lyme”, peridental e de *Rickettsia*.

Nos animais, tanto como acontece com outros antibióticos, a tetraciclina é usada tanto como produto terapêutico ou como promotor de crescimento, suplemento para a produção alimentar de origem animal.

Num estudo elaborado por Col & O'Connor em 1987, a tetraciclina era o segundo agente antimicrobiano mais utilizado no mundo, após as penicilinas. Na Grã-Bretanha, um ano após a introdução deste antibiótico na medicina veterinária em 1956, como promotor de crescimento nas rações de frangos, verificou-se um aumento considerável de estirpes de *Escherichia coli* resistentes à tetraciclina na ordem dos 3,5%.

2.1.4. β -lactâmicos

Os β -lactâmicos são bactericidas que actuam nas bactérias em crescimento. Estes antibióticos têm como alvo o peptidoglicano, principal componente da parede celular. A penetração do antibiótico na célula ocorre facilmente nas bactérias Gram positivas, atingindo rapidamente o seu alvo, as PLP (proteínas de ligação à penicilina) por ausência de “efeito de barreira” enquanto que nas bactérias Gram negativas, a complexidade de estrutura da parede celular é um obstáculo para estes antibióticos, tendo em conta a presença de porinas, as sucessivas barreiras e as β -lactamases.

Entre os mecanismos de resistência aos β -lactâmicos destacam-se as modificações das enzimas PLP por mutações, a obtenção de permeabilidade ao antibiótico na célula bacteriana, assim como a produção de β -lactamases. A produção de β -lactamases é mediada por genes de diferentes origens que podem estar presentes em plasmídeos, transposões ou mesmo no cromossoma das células bacterianas.

Da ligação β -lactâmico-PLP resultam complexos covalentes cuja formação se torna possível devido às semelhanças estruturais existentes entre o anel β -lactâmico e o substrato natural da enzima PLP.

Estas enzimas, quando livres dos produtos resultantes do complexo substrato-enzima que abandonam o centro de actividade da enzima, tornam-se novamente prontas para receber uma nova molécula do substrato como ocorre normalmente nas estirpes selvagens ou sensíveis.

E, no caso contrário, podem receber a molécula de um β -lactâmico que por sua vez inibe a acção das enzimas PLPs, produzindo-se deste modo, complexos irreversíveis cujo processo se caracteriza por 3 fases: (i) início de contacto entre o β -lactâmico e a enzima PLP; (ii) interacção preliminar com ligações fracas entre a enzima e o antibiótico; e (iii) formação de ligações fortes.

Para além da resistência mediada pela enzima periplasmática TEM-1 de origem plasmídica mas codificada por um transposição, é às vezes comum encontrar, em algumas estirpes bacterianas do género *Haemophilus*, uma resistência à ampicilina provocada pela diminuição da afinidade deste antibiótico ao seu alvo, as enzimas PLPs (PLP4 e PLP5), não se verificando neste caso, uma resistência mediada pelas enzimas β -lactamases.

A resistência à ampicilina mediada pela produção de β -lactamase associada às estirpes de *Campylobacter* parece ser codificada ao nível do cromossoma (Taylor & Courvalin, 1988).

As estirpes de *Campylobacter*, independentemente da estrutura da sua parede celular (Gram negativas) e baixo teor de G-C, apresentam uma capacidade de aquisição de resistência a este antibiótico através de genes provenientes de outras bactérias, quer Gram negativas, quer Gram positivas. A presença de alguns genes como *tetO*, *aphA-1*, *aphA-3*, capazes de integrar um plasmídeo, e que são provavelmente considerados indígenas para as estirpes de *C. jejuni* e *C. coli*, podem ocasionalmente ser encontrados no cromossoma (Ng *et al.*, 1987).

2.1.5. Aminoglicósidos

A estreptomicina faz parte da importante família de aminoglicosídeos-aminocíclicos. Este antibiótico é geralmente usado em associação com outras substâncias terapêuticas no tratamento da tuberculose e brucelose, assim como em infecções causadas por outras espécies bacterianas.

Estes antibióticos caracterizados por uma boa actividade bactericida actuam ao nível ribossomal, tendo como alvo principal a sub-unidade 30S, da qual resulta a inibição da síntese de proteínas.

A presença de actividade de enzimas, 6-nucleotidiltransferase ou da 3''-9-nucleotidiltransferase, codificadas a nível do cromossoma, é determinante na resistência das estirpes de *Campylobacter* a este antibiótico. Mas outros mecanismos de resistência podem ser encontrados em diferentes espécies bacterianas.

A resistência intrínseca à estreptomicina que naturalmente se pode verificar nas estirpes de *Streptococcus* deve-se provavelmente à estrutura da sua membrana externa, enquanto que nas bactérias Gram negativas, isto resulta das características do transporte activo destes antibióticos (Veiga *et al.* 1984).

De acordo com as informações acima expostas, alguns programas de vigilância e controlo que justificam a avaliação permanente da susceptibilidade de microrganismos aos diferentes antibióticos tornam-se indispensáveis, pois a situação actual relativamente ao uso de antibióticos como recursos no combate à infecção é preocupante.

2.2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.2.1. Princípios metodológicos

Do ponto de vista metodológico, avaliar a susceptibilidade de um microrganismo a um ou mais agentes antimicrobianos é confrontar “in vitro” este microrganismo com este (s) antibiótico (s) em diferentes concentrações.

No entanto, sabe-se que os antibióticos apresentam uma actividade antimicrobiana como propriedade comum. Isto quando se trata, quer das substâncias antimicrobianas produzidas pelos microrganismos ou derivados semi-sintéticos dos mesmos, quer os agentes quimioterapêuticos, produtos sintéticos derivados dos processamentos químicos laboratoriais.

Mas de acordo com os estudos existentes, nem todos os organismos podem ter a mesma susceptibilidade a um determinado antibiótico. Pelo que esta propriedade varia com a espécie, estirpe ou ainda com o tipo de antibiótico que, por sua vez, depende da concentração utilizada no teste.

O tratamento quimioterapêutico de uma infecção microbiana depende não somente de uma escolha adequada do antibiótico de eleição mas também e sobretudo de uma avaliação prévia da sensibilidade deste agente antimicrobiano.

A avaliação ou determinação da susceptibilidade aos antibióticos é efectuada de várias maneiras, sendo a técnica de antibiograma e a determinação de concentrações mínimas inibitórias as mais usadas em laboratórios quer para fins clínicos, quer para investigação.

1. Técnica de antibiograma

O antibiograma, geralmente utilizado nos exames clínicos de rotina, consiste na confrontação de culturas bacterianas inoculadas na superfície de um meio de cultura (agar sólido) com uma solução de antibiótico embebida num disco de papel de filtro, normalmente comercializados pelas empresas Oxoid, Merck, Difco, etc.

A padronização desta técnica baseia-se na correlação dos halos de inibição produzidos à volta do disco com as concentrações mínimas inibitórias (Bauer *et al.*, 1966).

Isto levou a comunidade científica a adoptar a designação de Método de Kirby – Bauer, ao mesmo tempo que instituições como a FDA (Food & Drug Administration) e o NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards; actualmente CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute) aprovaram a recomendação deste método nos trabalhos de laboratórios clínicos.

No entanto, muitos factores podem ter um papel importante na determinação de tipos e de diâmetros de halos de inibição. Entre estes factores destacam-se:

- A velocidade de crescimento, o tempo de incubação e a difusão do agente microbiano no agar.
- A composição e a espessura do meio de cultura.
- A quantidade de inóculo utilizada (a quantidade de células recomendada para um inóculo no método de diluições em agar sólido é de 10^4 CFU).

Outros factores que podem ainda afectar o diâmetro da zona de inibição são:

- O pH do meio de cultura.
- As concentrações de iões como Mg^{2+} e Ca^{2+} que afectam a sensibilidade de algumas bactérias como *Pseudomonas aeruginosa* aos aminoglicosídeos. É recomendada uma proporção de 10 a 30 mg de iões livres de Mg^{2+} por litro e 50 a 60 mg de iões livres de Ca^{2+} por litro no meio de cultura (Müller-Hinton).

2. Determinação de concentrações mínimas inibitórias

Este método baseia-se no mesmo princípio de confrontações de culturas microbianas inoculadas na superfície de um meio de cultura, particularmente, um agar sólido no qual se deixa difundir as gotas das diferentes diluições seriadas de antibióticos, previamente preparadas.

As susceptibilidades das estirpes seleccionadas para este trabalho foram obtidas pela determinação das concentrações mínimas inibitórias (CMI) utilizando o método de difusão em agar sólido (Figura 2.1), sendo a distribuição e a inoculação das estirpes em placas feita através de um sistema automatizado apropriado (Multipoint).

A técnica consiste em confrontar diluições seriadas de um agente antimicrobiano com um microrganismo, e considera-se a CMI do antibiótico para esta bactéria, a menor concentração (Unidades/ml ou $\mu\text{g/ml}$) que inibe o seu crescimento.

De acordo com os valores propostos pelo NCCLS (TABELA 2.7) e com base nos resultados obtidos as estirpes foram classificadas em 3 grupos distintos: **Sensíveis**, **Intermédias** e **Resistentes** simbolizados pelas letras S, I e R, respectivamente.

Segundo as recomendações do NCCLS, foi utilizado o agar de Müller-Hinton (MHA) que é indicado para o estudo das bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas.

Dado que as estirpes em estudo neste trabalho, pertencentes ao género *Campylobacter*, são de crescimento lento, este meio foi suplementado com 5% de sangue de cavalo desfibrinado.

Antibióticos	Sensível	Intermédia	Resistente
Acido nalidíxico	≤ 16	-	≥ 32
Ampicilina	≤ 8	16	≥ 32
Ciprofloxacina	≤ 1	2	≥ 4
Claritromicina	≤ 2	4	≥ 8
Eritromicina	≤ 0.5	1-4	≥ 8
Estreptomicina	≤ 6.25	12.5	≥ 25
Tetraciclina	≤ 4	8	≥ 16

TABELA 2.7:
Valores de concentrações críticas dos antibióticos propostos pelo NCCLS ($\mu\text{g/ml}$).

2.2.2. Procedimentos técnicos (FIGURA 2.1)

1. Preparação das soluções dos antibióticos

- Dissolveram-se 100 mg de cada antibiótico em 100 ml do solvente (TABELA 2.8)².
- Prepararam-se diluições sucessivas em tubos de ensaio com água destilada estéril para obter as concentrações desejadas (entre 0,97 $\mu\text{g/ml}$ e 1000 $\mu\text{g/ml}$).
- Adicionou-se um volume de 2ml de cada diluição de antibiótico a 18 ml de agar (Müller – Hinton) previamente preparado e mantido a 50°C, passando-se a obter placas com as concentrações entre 0,097 $\mu\text{g/ml}$ e 100 $\mu\text{g/ml}$.

2. Inoculação das suspensões de estirpes

- Preparar uma suspensão da cultura em tubo de ensaio com água destilada estéril, de modo a obter uma concentração equivalente a 1 na escala de McFarland.
- Colocar as suspensões de cada estirpe no suporte previamente esterilizado do aparelho de inoculação (Multipoint).
- Desinfectar os pinos do aparelho de inoculação por flamejamento com álcool.
- Arrefecer os pinos mergulhando-os no suporte contendo as suspensões das culturas em estudo.
- Secar as placas numa estufa durante 20 minutos a 37°C.

¹ Para os antibióticos não hidrossolúveis foi utilizado um solvente orgânico sem actividade bacteriostática ou bactericida, como neste caso, a Dimetilformamida (DMF).

- Inocular as estirpes em placas começando da menor para a maior concentração.
- Secar as placas inoculadas e incubá-las invertidas a 37°C durante 48 horas, em condições de micro-aerofilia.

3. Preparação das diluições dos antibióticos usados

Na preparação das soluções de stock dos diferentes antibióticos foi utilizada como solvente H₂O e DMF (Dimetilformamida) enquanto que todas as diluições foram realizadas com H₂O (TABELA 2.8).

A partir de antibiótico em pó, comercialmente adquirido, foi preparada uma solução-stock para cada um dos 7 antibióticos em estudo, que foi seguidamente filtrada em condições de assépsia com um filtro “Millipore” com 0,45 µm de diâmetro.

Antibióticos	Diluentes	Solventes
Ácido Nalidíxico	Água	Água
Ampicilina	Água	Água
Ciprofloxacina	Água	Água*
Clarithromicina	Água	DMF
Eritromicina	Água	DMF
Estreptomicina	Água	Água*
Oxitetraciclina	Água	Água

TABELA 2.8:
Apresentação dos
antibióticos usados com os
respectivos solventes e
diluentes.

DMF: Dimetilformamida; * Água destilada.

4. Série de diluições

Apesar dos limites normalmente recomendados variarem entre 256 mg/l (limite superior) e 0,25 mg/l (limite inferior), os limites utilizados neste trabalho foram alargados situando-se entre 1000 e 0,96 mg/l.

- Preparar uma solução-stock para cada antibiótico dissolvendo 1000 mg do antibiótico num litro de solvente.
- Adicionar 2 ml de cada solução a 18 ml de agar Müller-Hinton num balão previamente preparado.
- Agitar suavemente e depois verter os 20 ml de mistura obtida (1/10) em placa de Petri.
- Deixar arrefecer à temperatura ambiente até a solidificação do meio.

- Inocular as culturas bacterianas em placa com agar/antibiótico utilizando o sistema automatizado “Multipoint” que permite a inoculação simultânea de 21 estirpes numa única placa.
- A inoculação foi efectuada partindo da concentração mais baixa do antibiótico para a mais elevada.
- As placas inoculadas com as estirpes foram incubadas na posição invertida após um breve período de secagem na estufa, obedecendo às condições de micro-aerofilia já referenciadas neste trabalho.

Na TABELA 2.9 apresentam-se as concentrações mínimas inibitórias de alguns antibióticos estabelecidas para as estirpes de referência usadas neste ensaio.

Antibióticos	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Ácido nalidíxico	1.0 – 4.0	-
Ampicilina	2.0 – 8.0	-
Tetraciclina	1.0 – 4.0	8.0 – 3.2

TABELA 2.9:
Concentrações mínimas inibitórias
(µg/ml) de alguns antibióticos
nas estirpes de referência usadas

Nota: As placas com agar/antibióticos assim preparadas foram conservadas a 4°C antes da sua utilização quando necessário, por períodos inferiores a uma semana.

O período decorrido entre a preparação do inóculo e a sua transferência em placa não ultrapassou os 45 minutos.

As estirpes *Escherichia coli* ATCC 2522 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, cujas concentrações mínimas inibitórias são conhecidas para alguns antibióticos foram utilizadas como estirpes de referência (TABELA 2.9).

No início de cada processo de inoculação, foram inoculadas placas-controlo sem antibióticos com o objectivo de controlar a viabilidade de cada suspensão celular enquanto que no final do mesmo processo foram inoculadas outras placas nas mesmas condições para detectar as possíveis contaminações.

Para assegurar a reprodutibilidade da técnica, foram efectuadas réplicas de estirpes aleatoriamente escolhidas representando 10% das estirpes em estudo.

A FIGURA 2.1 esquematiza o procedimento experimental aplicado na realização dos testes de susceptibilidade das estirpes de *Campylobacter* neste ensaio.

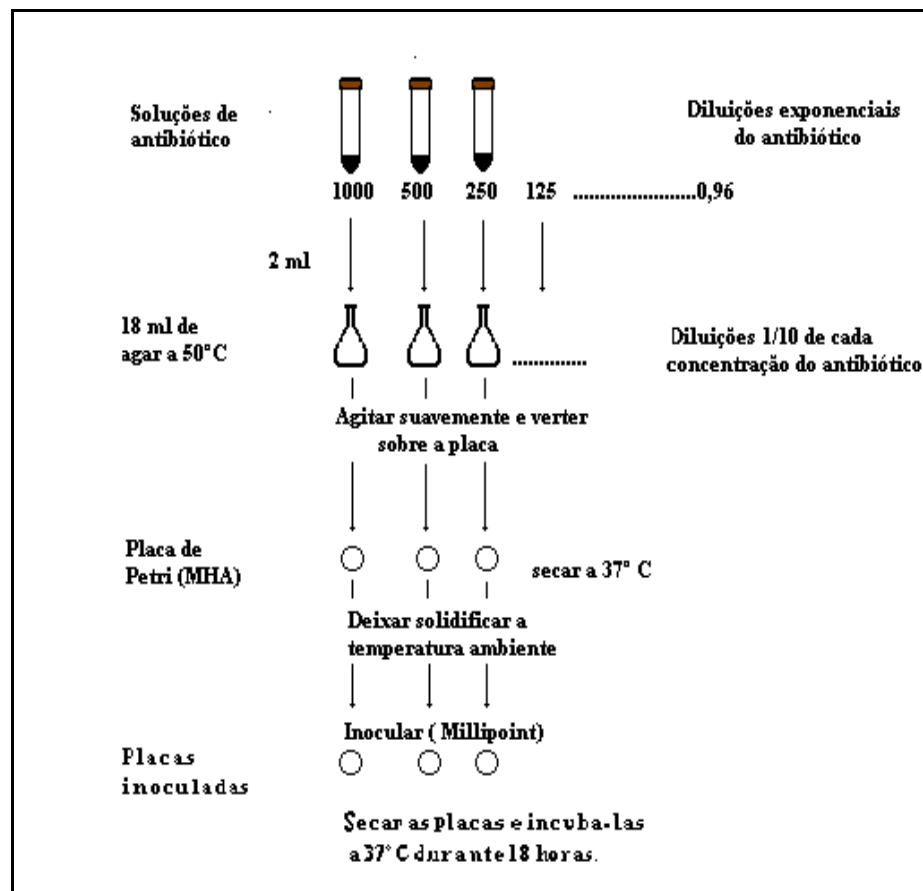


Figura 2.1: Fluxograma do procedimento experimental seguido na aplicação do método de difusão em agar

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise dos resultados obtidos sobre a susceptibilidade aos antibióticos incidiu sobre as CMI's das estirpes, começando com as amostras de Angola e depois as de proveniência portuguesa. Sabe-se que, com os valores das CMI's obtidos, pode-se avaliar os níveis de actividade de cada um dos 7 antibióticos em estudo e que a interpretação traduz-se numa análise qualitativa relacionada com o comportamento de cada estirpe em relação aos antibióticos.

Assim, as TABELAS 2.10 e 2.11 mostram as CMI's ($\mu\text{g/ml}$) obtidas com os 7 antibióticos nas estirpes de Angola e Portugal, respectivamente. Com base nos valores críticos propostos pelo NCCLS, a cada valor de CMI foi atribuída uma interpretação qualitativa, colocando a estirpe correspondente na categoria de resistente (R), intermediária (I) ou susceptível (S) para um determinado antibiótico.

Partindo disso, foram definidos diversos perfis de susceptibilidade ou resistotipos, quer entre as estirpes de Angola, quer com as das amostras de Portugal ou ainda com a totalidade de estirpes oriundas de ambas as origens deste estudo.

Os resultados são apresentados em forma de gráficos e tabelas. A discussão destes resultados é feita baseando-se nos resultados de outros trabalhos já existentes.

De todas as 187 estirpes em estudo, apenas 143 ou sejam 76,5% foram submetidas às provas de susceptibilidade aos antibióticos, sendo 67 (46,9%) e 76 (53,1%) das quais isoladas das amostras provenientes de Angola e de Portugal, respectivamente.

As estirpes de origem angolana foram analisadas na sua totalidade enquanto que o número de estirpes da proveniência portuguesa submetidas a esta análise sofreu uma redução considerável, tendo sido apenas examinadas 63,3% (76/120). Esta situação deveu-se ao facto da instituição onde ocorreu este estudo ter sido fechada durante um longo período por motivos técnicos sob ordem superior (contaminação química de um dos seus laboratórios).

As FIGURAS 2.2 e 2.3, apresentam graficamente a distribuição das taxas de susceptibilidade, para os diferentes antibióticos em estudo neste trabalho, das estirpes de Portugal e Angola respectivamente.

Os resultados apresentados na FIGURA 2.2 permitem-nos verificar que o número de estirpes resistentes ao ácido nalidíxico e ciprofloxacina é elevado, sendo 22,4% (17/76) e 10,5% (8/76), respectivamente.

TABELA 2.10: Concentrações mínimas inibitórias obtidas para as estirpes isoladas em Angola

Estirpes	Eritromicina	Clarithromicina	Ampicilina	Estreptomicina	Oxitetraciclina	Ácido Nalid.	Ciprofloxacina							
01A	0,78	I	0,39	S	12,5	I	1,56	S	0,39	S	6,25	S	0,097	S
02A	0,78	I	0,39	S	12,5	I	1,56	S	0,195	S	3,12	S	0,097	S
03A	0,39	S	0,39	S	25	I	0,78	S	0,097	S	3,12	S	0,097	S
04A	0,39	S	0,39	S	6,25	S	1,56	S	0,39	S	6,25	S	0,097	S
05A	3,12	I	6,25	I	6,25	S	0,78	S	0,78	S	100	R	25	R
06A	0,39	S	0,39	S	6,25	S	0,78	S	0,39	S	100	R	12,5	R
07A	0,195	S	0,39	S	1,56	S	0,39	S	0,78	S	6,25	S	0,097	S
08A	1,56	I	3,12	I	12,5	I	0,78	S	0,78	S	100	R	25	R
09A	0,78	I	0,78	S	6,25	S	1,56	S	0,39	S	100	R	3,12	I
10A	0,78	I	3,12	I	25	I	6,25	S	0,78	S	12,5	S	0,195	S
11A	0,39	S	0,78	S	12,5	I	1,56	S	0,39	S	6,25	S	0,097	S
12A	0,39	S	0,39	S	12,5	I	0,78	S	0,39	S	6,25	S	0,097	S
13A	0,39	S	1,56	S	1,56	S	1,56	S	0,195	S	6,25	S	1,56	I
14A	0,39	S	0,39	S	12,5	I	1,56	S	0,195	S	12,5	S	12,5	R
15A	0,39	S	0,78	S	6,25	S	1,56	S	0,195	S	>100	R	12,5	R
16A	0,78	IS	0,78	S	12,5	I	1,56	S	0,195	S	12,5	S	12,5	R
17A	0,78	I	0,78	S	12,5	I	1,56	S	0,39	S	6,25	S	0,195	S
18A	0,78	I	3,12	I	12,5	I	1,56	S	0,78	S	100	R	25	R
19A	3,12	I	6,25	I	6,25	S	1,56	S	0,78	S	>100	R	25	R
20A	0,39	S	0,195	S	6,25	S	1,56	S	0,195	S	100	R	6,25	R
21A	3,12	I	6,25	I	12,5	I	1,56	S	0,78	S	>100	R	25	R
22A	50	R	50	R	>100	R	100	R	25	R	>100	R	25	R
23A	1,56	I	6,25	I	12,5	I	3,12	S	0,39	S	>100	R	25	R
24A	0,39	S	0,39	S	12,5	I	0,78	S	0,195	S	12,5	S	0,097	S
25A	0,39	S	0,195	S	3,12	S	1,56	S	0,39	S	6,25	S	0,097	S
26A	0,39	S	0,39	S	12,5	I	0,78	S	0,39	S	100	R	12,5	R
27A	3,12	I	1,56	S	6,25	S	1,56	S	0,78	S	>100	R	25	R
28A	0,78	S	0,78	S	6,25	S	3,12	S	0,39	S	6,25	S	0,195	S
29A	0,78	I	0,78	S	25	I	3,12	S	0,78	S	100	R	1,56	S
30A	0,78	I	0,39	S	6,25	S	1,56	S	0,097	S	6,25	S	0,097	S
31A	0,78	I	0,78	S	12,5	I	3,12	S	1,56	S	6,25	S	0,39	S
32A	0,39	S	0,39	S	6,25	S	1,56	S	0,39	S	100	R	12,5	R
33A	0,78	I	0,78	S	12,5	I	1,56	S	0,78	S	25	S	3,12	I
34A	3,12	I	6,25	I	12,5	I	1,56	S	1,56	S	>100	R	25	R
35A	0,78	I	0,78	S	6,25	S	3,12	S	0,39	S	6,25	S	0,195	S
36A	3,12	I	12,5	R	25	I	3,12	S	1,56	S	>100	R	25	R
37A	1,56	I	0,39	S	6,25	S	3,12	S	1,56	S	>100	R	1,56	I
38A	0,39	S	1,56	S	6,25	S	3,12	S	0,39	S	0,39	S	0,195	S
39A	0,39	S	0,78	S	6,25	S	6,25	S	0,39	S	>100	R	12,5	R
40A	0,39	S	0,78	S	6,25	S	6,25	S	0,39	S	>100	R	6,25	R
41A	3,12	I	3,12	I	12,5	I	6,25	S	1,56	S	>100	R	6,25	R
42A	0,78	I	0,78	S	6,25	S	1,56	S	0,39	S	100	R	3,12	I
43A	12,5	R	3,12	I	6,25	S	1,56	S	0,78	S	>100	R	50	R
44A	0,39	S	0,78	S	1,56	S	0,78	S	1,56	S	6,25	S	0,39	S
45A	0,78	I	1,56	S	12,5	I	3,12	S	0,39	S	12,5	S	0,195	S
46A	0,78	I	1,56	S	12,5	I	6,25	S	0,39	S	>100	R	12,5	R
47A	1,56	I	3,12	I	12,5	I	6,25	S	0,39	S	>100	R	12,5	R
48A	0,39	S	1,25	S	6,25	S	3,12	S	0,39	S	>100	R	6,25	R
49A	0,78	I	1,56	S	100	R	1,56	S	100	R	>100	R	25	R
50A	0,39	S	0,097	S	6,25	S	1,56	S	0,39	S	>100	R	12,5	R
51A	12,5	R	6,25	I	6,25	S	6,25	S	6,25	S	6,25	S	0,39	S
52A	0,78	I	0,78	S	6,25	S	1,56	S	0,195	S	100	R	6,25	R
53A	1,56	I	1,56	S	3,12	S	1,56	S	0,39	S	6,25	S	0,097	S
54A	12,5	R	6,25	I	6,25	S	1,56	S	6,25	S	>100	R	25	R
55A	0,39	S	0,39	S	6,25	S	0,78	S	0,39	S	3,12	S	0,097	S
56A	0,78	I	1,56	S	25	I	6,25	S	0,78	S	>100	R	25	R
57A	0,78	I	0,78	S	12,5	I	1,56	S	0,39	S	12,5	S	0,097	S
58A	0,39	S	0,78	S	6,25	S	3,12	S	0,78	S	>100	R	6,25	R
59A	0,78	I	0,78	S	6,25	S	1,56	S	0,78	S	6,25	S	0,097	S
60A	0,39	S	3,12	I	3,12	S	1,56	S	0,39	S	25	S	0,195	S
61A	0,78	I	0,39	S	6,25	S	3,12	S	0,195	S	6,25	S	0,195	S
62A	0,78	I	0,39	S	6,25	S	1,56	S	0,39	S	>100	R	25	R
63A	0,78	I	1,56	S	6,25	S	3,12	S	0,78	S	6,25	S	0,195	S
64A	1,56	I	12,5	R	6,25	S	6,25	S	1,56	S	>100	R	25	R
65A	0,78	I	0,39	S	6,25	S	3,12	S	0,39	S	100	R	12,5	R
66A	3,12	I	3,12	I	0,78	S	6,25	S	3,12	S	>100	R	50	R
67A	0,78	I	0,39	S	6,25	S	3,12	S	0,39	S	12,5	S	0,195	S

TABELA 2.11: Concentrações mínimas inibitórias obtidas para as estirpes isoladas em Portugal

Estirpes	Eritromicina	Claritromicina	Ampicilina	Estreptomicina	Oxitetraciclina	Ácido nalid	Ciprofloxacina	
S01	1,56	I	3,125	I	12,5	I	1,56	I
S04	0,39	S	0,78	S	6,25	S	0,39	S
S06	1,56	I	0,78	S	1,56	S	0,39	S
S09	1,56	I	0,78	S	1,56	S	0,39	S
S15	0,78	I	1,56	S	12,5	I	1,56	I
S17	0,097	S	0,097	S	6,25	S	25	R
S22	3,125	I	1,56	S	3,125	S	1,56	S
S32	6,25	I	3,125	I	12,5	I	0,78	S
S35	1,56	I	1,56	S	3,125	S	1,56	S
S36	1,56	I	1,56	S	12,5	I	1,56	S
S37	3,125	I	3,125	I	12,5	I	0,78	S
S41	1,56	I	1,56	S	6,25	S	0,78	S
S42	1,56	I	0,78	S	6,25	S	0,39	S
S43	3,125	I	6,25	I	12,5	I	1,56	S
S46	0,78	I	1,56	S	12,5	I	1,56	S
S47	1,56	I	0,78	S	1,56	S	0,39	S
S48	1,56	I	1,56	S	3,125	S	1,56	S
S51	1,56	I	1,56	S	6,25	S	0,78	S
S52	1,56	I	1,56	S	6,25	S	0,78	S
S53	1,56	I	0,78	S	1,56	S	0,39	S
S54	3,125	I	3,125	I	12,5	I	0,78	S
S55	3,125	I	3,125	I	12,5	I	1,56	S
S56	3,125	I	3,125	I	12,5	I	0,78	S
S57	6,25	I	6,25	I	12,5	I	0,78	S
S58	3,125	I	6,25	I	12,5	I	0,78	S
S59	3,125	I	3,125	I	25	I	1,56	S
S60	1,56	I	3,125	I	3,125	S	3,125	S
S61	1,56	I	1,56	I	6,25	S	3,125	S
S62	1,56	I	0,78	S	1,56	S	0,39	S
S63	1,56	I	3,125	I	3,125	S	6,25	S
S64	1,56	I	3,125	I	25	I	0,78	S
S65	1,56	I	3,125	I	12,5	I	0,78	S
S67	1,56	I	0,78	S	6,25	S	0,78	S
S68	3,125	I	3,125	I	12,5	I	0,78	S
S69	3,125	I	6,25	I	12,5	I	1,56	S
S70	3,125	I	3,125	I	6,25	S	>100	R
S72	3,125	I	3,125	I	12,5	I	0,78	S
S74	0,78	I	0,78	S	6,25	S	0,78	S
S76	3,125	I	3,125	I	3,125	S	1,56	S
S77	1,56	I	1,56	S	3,125	S	1,56	S
S78	0,78	I	1,56	S	6,25	S	0,78	S
S79	1,56	I	3,125	I	12,5	I	3,125	S
S80	1,56	I	3,125	I	12,5	I	1,56	S
S81	6,25	I	3,125	I	12,5	I	0,78	S
S82	1,56	I	0,78	S	6,25	S	1,56	S
S83	1,56	I	0,78	S	1,56	S	0,39	S
S84	6,25	I	6,25	I	12,5	I	3,125	S
S86	3,125	I	0,78	S	1,56	S	0,39	S
S87	1,56	I	0,39	S	6,25	S	0,39	S
S88	3,125	I	3,125	I	12,5	I	1,56	S
S89	50	R	50	R	12,5	I	6,25	S
S90	1,56	I	3,125	I	12,5	I	3,125	S
S91	1,56	I	3,125	I	6,25	S	1,56	S
S92	3,125	I	1,56	S	6,25	S	>100	R
S93	25	R	25	R	50	R	>100	R
S94	3,125	I	6,25	I	12,5	I	1,56	S
S95	1,56	I	1,56	S	6,25	S	0,78	S
S96	3,125	I	6,25	I	12,5	I	1,56	S
S97	0,78	I	1,56	S	6,25	S	0,78	S
S98	3,125	I	3,125	I	6,25	S	0,78	S
S99	0,39	S	0,78	S	6,25	S	0,78	S
S100	3,125	I	6,25	I	12,5	I	1,56	S
S101	3,125	I	3,125	I	12,5	I	1,56	S
S103	0,78	I	1,56	S	0,39	S	1,56	S
S104	0,78	I	1,56	S	0,39	S	6,25	S
S105	1,56	I	1,56	S	6,25	S	0,78	S
S106	0,78	I	1,56	S	6,25	S	0,78	S
S109	3,125	I	6,25	I	12,5	I	1,56	S
S110	0,78	I	1,56	S	0,39	S	6,25	S
S111	1,56	I	1,56	S	6,25	S	0,78	S
S112	1,56	I	1,56	S	12,5	I	1,56	S
S113	1,56	I	1,56	S	3,125	S	1,56	S
S114	6,25	I	3,125	I	12,5	I	0,78	S
S117	1,56	I	1,56	S	3,125	S	1,56	S
S118	1,56	I	3,125	I	6,25	S	0,78	S
S120	0,78	I	1,56	S	0,39	S	1,56	S

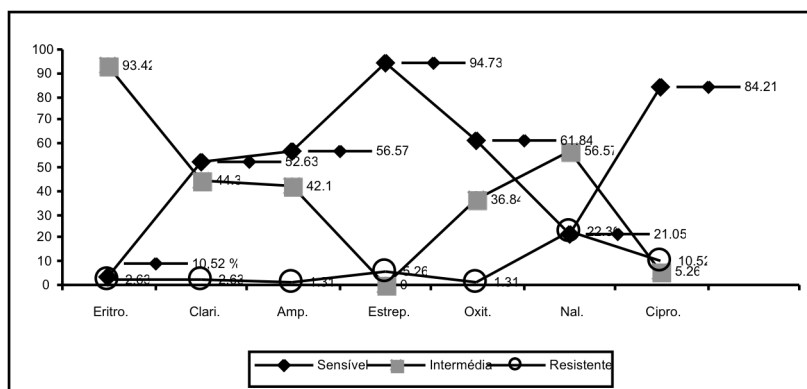


FIGURA 2.2:
Gráfico das frequências (%)
de estirpes de *Campylobacter*
spp., isoladas em Portugal

Em relação aos outros antibióticos, além da estreptomicina que atingiu uma taxa de resistência de 5,3% (4/76) de estirpes, consta que os números exibidos foram muito baixos, sendo 1,3% (1/76) para a ampicilina e a tetraciclina, simultaneamente e 2,6% (2/76) para cada um dos macrólidos em estudo, a eritromicina e a claritromicina.

Na mesma figura, verifica-se também que as taxas de estirpes com susceptibilidade intermédia foram elevadas em relação a estes antibióticos, sendo a estreptomicina e a ciprofloxacina as únicas exceções, por ter registado as taxas de zero e 5,3% (4/76), respectivamente.

A eritromicina, geralmente considerada como o antibiótico de eleição para o tratamento das infecções humanas causadas por *Campylobacter* spp. foi observada com uma taxa de resistência de 2,6% acompanhada de um número bastante elevado de estirpes com sensibilidade intermédia.

Na verdade, este resultado pode ser visto como um mau sinal para o futuro deste agente antimicrobiano, uma vez que a aquisição de resistência por parte das bactérias é considerada um processo progressivo, ao longo do qual as bactérias podem transitar de sensíveis a resistentes, passando pelos diferentes níveis de susceptibilidade intermédia.

O gráfico da FIGURA 2.3 apresenta a distribuição de estirpes de *Campylobacter* spp. isoladas das amostras de Angola por categorias de susceptibilidade (S, I, R) em relação aos agentes antimicrobianos testados.

Em relação as amostras de Angola, 98,5 e 94,0% dos isolados foram sensíveis a estreptomicina e a oxitetraciclina, respectivamente. Quanto a outros antibióticos tais como a claritromicina e a ampicilina, as taxas de sensibilidade das estirpes foram também muito elevadas, atingindo 73,1 e 58,2%, respectivamente.

Em relação à resistência destas estirpes aos antibióticos desta família, valores de 6,0% e 4,5% foram, respectivamente obtidos. O que demonstra claramente a tendência de aumento de estirpes resistentes aos macrólidos nas estirpes de *Campylobacter* spp. como tem sido demonstrado em vários estudos existentes.

Por sua vez, para as quinolonas, apesar das taxas muito elevadas de estirpes sensíveis como demonstra a FIGURA 2.3, registaram-se números consideravelmente elevados de estirpes resistentes, sendo 55,2% (37/67) para o ácido nalidíxico e 50,7% (34/67) para a ciprofloxacina. Portanto, mais da metade de estirpes isoladas das amostras de Angola apresenta resistência a estes antibióticos.

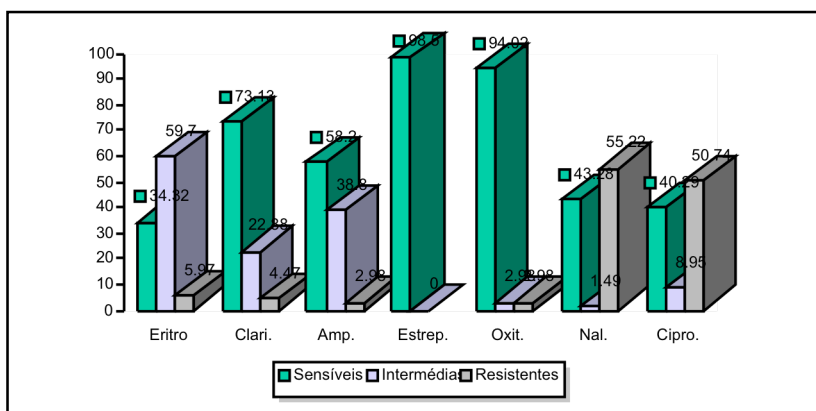


FIGURA 2.3:
Gráfico das frequências (%) de susceptibilidade das estirpes isoladas em Angola.

Comparando as taxas de resistência entre ambas as origens (Angola e Portugal), é notório constatar que nas amostras de Angola houve mais estirpes resistentes aos macrólidos que nas de Portugal. Como se pode observar nas FIGURAS 2.2 e 2.3, em cada um destes antibióticos a taxa obtida nas amostras de Angola (6,0% e 4,5%) foi o dobro da taxa registada entre as estirpes de Portugal (2,6%).

Os restantes antibióticos utilizados neste estudo tiveram as taxas de estirpes resistentes relativamente baixas ou seja na ordem de 1,5% (1/67) para estreptomicina, e de 3,0% (2/67) para ampicilina e oxitetraciclina.

Tal como acontece com as amostras de Portugal, o que chama a atenção neste estudo, é número muito elevado de estirpes com a susceptibilidade intermédia em alguns dos antibióticos tais como a eritromicina, 59,7% (40/67), claritromicina 22,9% (15/67), ampicilina 38,8% (26/67), ácido nalidíxico e ciprofloxacina com 1,5 e 9,0%, respectivamente.

A estreptomicina foi o único antibiótico no qual se registou uma sensibilidade intermédia nula, enquanto que a oxitetraciclina teve 3,0% de estirpes a este nível.

Utilizando os resultados de concentrações mínimas inibitórias obtidas com as estirpes de Angola, foi construída a TABELA 2.12 que mostra a distribuição de frequências de estirpes isoladas das amostras de Angola, relativamente a valores de CMI para cada um dos antibióticos testados.

Nesta tabela, para as concentrações de 0,78 e 0,39 µg/ml de eritromicina foram encontradas 26 e 22 estirpes, respectivamente. A claritromicina, nas mesmas concentrações, teve a sua maior distribuição, apresentando 18 estirpes em cada uma destas concentrações enquanto que a distribuição mais elevada de estirpes para a ampicilina foi partilhada entre as concentrações de 12,5 e 6,25 g/ml, com 21 e 32 estirpes, respectivamente.

Nas quinolonas, as maiores incidências de estirpes foram registadas nas concentrações de > 100, 100 e 6,25 µg /ml para o ácido nalidíxico com 35,8% (24/67), 16,4% (11/67) e 26,9% (18/67), enquanto que para a ciprofloxacina as taxas obtidas foram de 22,4% (15/67), 20,9% (14/67) e 16,4% (11/67) e 14,9% (10/67) nas concentrações de 25, 0,097, 12,5 e 0,195 µg/ml de antibióticos, respectivamente.

[µg/ml]	Eritro.	Clari.	Ampi.	Estrep.	Oxit.	Nal.	Cipro.
>100	-	-	1	-	-	24	-
100	-	-	1	1	1	11	-
50	1	1	-	-	-	-	2
25	-	-	5	-	1	2	15
12,5	3	2	21	-	-	7	11
6,25	-	7	32	10	2	18	6
3,12	8	8	3	15	1	3	3
1,56	6	10	3	31	7	-	3
0,78	26	18	1	9	15	-	-
0,39	22	18	-	1	29	1	3
0,195	1	2	-	-	9	-	10
0,097	-	1	-	-	2	-	14

TABELA 2.12:
Distribuição de estirpes da origem angolana por concentrações mínimas inibitórias (µg/ml).

Eritro.: Eritromicina, Clari. Claritromicina, Ampi: Ampicilina, Estrep: Estreptomicina, Oxit: Oxitetramicina, Nal: Ácido Nalidíxico, Cipro.: Ciprofloxacina. I: Intermédia; R: Resistente; S: Sensível.

A estreptomicina, ampicilina e a oxitetraciclina, embora com alguns registos de estirpes em concentrações elevadas, tiveram a maior distribuição de estirpes a meio ou abaixo da tabela acima referida.

Assim tivemos nos 12,5 e 6,25 µg /ml de ampicilina, 31,3% (21/67) e 47,7% (32/67), nos 3,12 e 1,56 µg /ml de estreptomicina, 22,4% (15/67) e 46,3% (31/67), e nos 0,78 e 0,39 µg /ml de oxitetraciclina, 22,4% (15/67) e 43,3% (29/67) de estirpes, respectivamente.

Em relação às CMI's das estirpes de Portugal, foi construída a TABELA 2.13 com o mesmo objectivo que motivou a elaboração da TABELA 2.12.

Os resultados apresentados nesta tabela mostram que os macrólidos tiveram maiores incidências nas CMI's 3,12 µg /ml, com 28,9% (22/76) e 1,56 µg /ml com 44,7% (34/76) para a eritromicina, e com 32,9% (25/76) em cada uma das duas concentrações acima referidas para a claritromicina.

Portanto, para estes antibióticos 93,4% e 94,7% das estirpes analisadas tinham CMI inferiores a 6,25 µg /ml mas superiores a 0,78 µg /ml. O que pode significar que a maior parte destas estirpes (71 ou 93,4% e 34 ou 44,7%, respectivamente) apresentou valores de susceptibilidade intermédia.

TABELA 2.13:

Distribuição dos isolados em Portugal por concentrações mínimas inibitórias (µg/ml).

[µg/ml]	Eritro	Clari.	Ampi.	Estrep.	Oxit.	Nal.	Cipro.
>100	-	-	-	3	1	4	-
100	-	-	-	-	-	4	-
50	1	1	1	-	-	9	4
25	1	1	2	1	-	43	-
12,5	-	-	30	-	13	6	1
6,25	5	9	23	4	15	3	3
3,12	22	25	9	5	28	7	-
1,56	34	25	7	27	11	-	4
0,78	10	13	-	26	5	-	23
0,39	2	1	4	10	2	-	31
0,195	-	-	-	-	1	-	4
0,097	1	1	-	-	-	-	6

Eritro.: Eritromicina, Clari.: Claritromicina, Ampi.: Ampicilina, Estrep.: Estreptomicina, Oxit.: Oxitetraciclina, Nal.: Ácido Nalidíxico, Cipro.: Ciprofloxacina. 0: Intermédia; +: Resistente; -: Sensível.

Os resultados da TABELA 2.13 demonstram também que as estirpes portuguesas em estudo têm as CMI's muito elevadas para o ácido nalidíxico, pois variam entre 3,12 e > 100 µg /ml, sendo 25 µg /ml, a concentração de maior distribuição ou sejam 56,6% (43/76) das estirpes, seguida de 50 µg /ml com apenas 11,8% (9/76). Portanto, o maior número de estirpes resistentes a este antibiótico está relacionado com as elevadas concentrações mínimas encontradas.

Estes resultados não demonstram a mesma tendência de resistência cruzada ocorrida entre as quinolonas nas estirpes provenientes de Angola, pelo que foram registados perfis diferentes quanto à distribuição de estirpes em CMI. Todas estas bactérias apresentaram CMIs mais elevadas de ácido nalidíxico que de ciprofloxacina, cujas concentrações em questão foram de níveis mais baixos até aos 12,5 µg/ml.

Mas por falta de uniformidade dos valores críticos recomendados pelo NCCLS, dos quais depende a determinação qualitativa do comportamento de estirpes face aos antibióticos, estes perfis não podem sugerir uma tendência idêntica para ambas as quinolonas, em particular ou para os antibióticos, em geral.

Em relação a estreptomicina e oxitetraciclina, pode-se dizer que ambos os antibióticos tinham o mesmo máximo ($> 100 \mu\text{g} / \text{ml}$) mas os seus mínimos diferenciam-se apenas por uma concentração (0,39 e 0,195 µg /ml, respectivamente). No entanto, para a estreptomicina, também com maiores registos entre as concentrações intermediárias que se encontram a meio da tabela, destacam-se as de 1,56 e 0,78 µg/ml com 35,5% (27/76) e 34,2% (26/76) das estirpes, respectivamente.

Quanto à ampicilina a maior distribuição de estirpes foi obtida entre 1,56 e 12,5 µg/ml de antibiótico, tendo sido obtidos 39,5% (30/76) e 30,3% (23/76) das estirpes nas concentrações de 12,5 e 6,25 µg/ml, respectivamente.

No total, estes números juntos constituem mais da metade de estirpes com sensibilidade intermédia entre os isolados testados para este antibiótico.

Ainda com as CMIs de todas as estirpes em estudo foram determinadas as CMI_{50} e CMI_{90} (TABELA 2.14), que são consideradas como as concentrações mínimas inibitórias nas quais o crescimento de 50% e 90% das estirpes é inibido.

Com esta tabela, pode-se observar os máximos dos valores de CMIs obtidos em todos os antibióticos quer com os isolados de Angola, quer com os de Portugal, variam entre 50 e 100 µg /ml, enquanto que os mínimos foram entre 0,097 e 3,12 µg /ml. Estes valores definem o intervalo de concentrações de cada um dos antibióticos em estudo.

Origem	Eritro		Clari.		Ampi.		Estrep.		Oxitetra.		Nal.		Cipro.	
	P	A	P	A	P	A	P	A	P	A	P	A	P	A
CMI_{50}	1,56	0,78	1,56	0,78	6,25	6,25	1,56	1,56	3,12	0,39	25	12,5	0,39	6,25
CMI_{90}	3,12	3,12	6,25	6,25	12,5	25	6,25	6,25	12,5	1,56	100	>100	6,25	50
MÍNIMO	0,097	0,195	0,097	0,097	0,39	0,78	0,39	0,39	0,195	0,097	3,12	0,39	0,097	0,097
MÁXIMO	50	50	50	50	50	>100	>100	100	>100	100	>100	>100	50	50

TABELA 2.14:
 CMI_{50} , CMI_{90} e as variações de intervalos das CMIs dos antibióticos obtidas com os isolados de Angola e de Portugal.

P: Portugal, A: Angola.

CMI_{50} : Concentração mínima inibitória pela qual o crescimento de 50% das estirpes é inibido.

CMI_{90} : Concentração mínima inibitória pela qual o crescimento de 90% das estirpes é inibido.

Por outro lado sabe-se que estirpes de uma determinada espécie, quer de *C. jejuni* quer de *C. coli*, de proveniências diferentes podem apresentar o mesmo perfil de susceptibilidade aos antibióticos, enquanto que estirpes da mesma origem, por sua vez podem apresentar comportamentos diferentes face a um ou a demais antibióticos.

Deste modo, consta que o agrupamento de estirpes provenientes da mesma origem em resistotipos diferentes reflecte claramente, do ponto de vista clínico ou mesmo epidemiológico, as dificuldades que geralmente se tem na escolha de agentes antimicrobianos para o tratamento das doenças infecciosas, como é caso da campilobacteriose.

Com base nisso, e atendendo os resultados de CMIs de antibióticos testados, foram construídas algumas tabelas que reflectem um sistema de resistotipia, através do qual é possível observar diferentes perfis de sensibilidade para as estirpes face aos 7 antibióticos testados.

Este sistema permitiu agrupar em 23, 22 e 40 resistotipos, as estirpes isoladas das amostras de Angola (TABELA 2.15), de Portugal (TABELA 2.16), e de ambas as origens (TABELA 2.17), respectivamente.

Na TABELA 2.15, foram registados 23 antibiótipos dos quais cerca de metade é representada por apenas uma única estirpe. Isto demonstra quanto é importante a determinação de CMIs, pois observa-se que uma grande diversidade de perfis pode ser obtida entre estirpes do mesmo ecossistema no que concerne o comportamento destas perante um ou muitos antibióticos.

Assim, os perfis com maior número de estirpes foram o RA15 que aparece com 9 (13,4%), seguido do RA10 com 8 (11,9%), RA2 e RA4 com 7 (10,4%) cada, e o RA13 com 6 (9,0%) estirpes.

Ainda nesta tabela, pode-se observar uma relação de resistência cruzada entre as quinolonas (ácido nalidíxico e ciprofloxacina) e que são presentes em 11 dos perfis obtidos com as estirpes de Angola, e cuja taxa total de estirpes envolvidas é de 47,7% ou seja 32 das 67 estirpes foram resistentes a ambas as quinolonas testadas.

Destas estirpes, 78,1% (25/32) foram identificadas como *C. coli* do biótipo I e 3,1% do biótipo II, enquanto que as restantes 5 ou 15,6% repartiram-se da seguinte forma; 4 (80%) isolados de *C. jejuni* II e 1 (20%) de *C. jejuni* I. Com estes resultados, verificou-se também que quase metade ou sejam 47,8% (32/67) das estirpes provenientes de Angola apresentou uma resistência cruzada para ambos os antibióticos da família das quinolonas, devendo-se isso provavelmente ao uso da flumequina, uma quinolona da terceira geração utilizada como suplemento alimentar na criação das aves, particularmente em Angola.

Mas as taxas de resistentes a estes antibióticos é um pouco mais elevada quando analisadas separadamente em cada um dos antibióticos. Assim, os valores registados foram 55,2% (37/67) e 50,7% para ácido nalidíxico e ciprofloxacina, respectivamente.

Tipos	Erit.	Clari.	Ampi.	Estrep.	Tetra.	NAL.	Cipro.	Nº de estirpes	C. coli		C. jejuni			
									I	II	I	II	III	
RA1	I	I	I	S	S	S	S	1	1					
RA2	I	I	I	S	S	R	R	7	5	1				
RA3	I	I	S	S	S	R	R	3	2			1		
RA4	I	S	I	S	S	S	S	7	5	2		1		
RA5	I	S	I	S	S	S	R	1	1					
RA6	I	S	I	S	S	R	I	1	1					
RA7	I	S	S	S	S	R	I	4	2	1		1		
RA8	I	S	S	S	S	R	R	4	4					
RA9	I	S	R	S	R	R	R	1	1					
RA10	I	S	S	S	S	S	S	8	5	1		1		
RA11	I	R	I	S	S	R	R	1			1			
RA12	I	R	S	S	S	R	R	1	1					
RA13	S	S	S	S	S	S	S	6	5			1		
RA14	S	S	S	S	S	S	I	1		1				
RA15	S	S	S	S	S	R	R	9	9					
RA16	S	S	I	S	S	S	R	1	1					
RA17	S	S	I	S	S	R	R	3	2			1		
RA18	S	I	S	S	S	I	S	1	1					
RA19	S	S	I	S	S	S	S	3	1	1		1		
RA20	R	I	S	S	S	R	R	1	1					
RA21	R	I	S	S	I	S	S	1	1					
RA22	R	I	S	S	I	R	R	1					1	
RA23	R	R	R	R	R	R	R	1					1	

TABELA 2.15:
Resistotipos obtidos com as estirpes de *Campylobacter* spp. isoladas em Angola.

Erit:Eritromicina, Clari. Claritromicina, Ampi: Ampicilina, Estrep: Estreptomicina, Tetra: Oxitetraclina, NAL: Ácido Nalidíxico, Cipro.: Ciprofloxacina; I: Intermédia; R: Resistente; S: Sensível.

Além dos casos de resistência cruzada revelados entre as duas quinolonas, foram também encontradas outras situações de multi-resistência nas quais se destaca a predominância das estirpes de *C. coli*.

Isto verificou-se nas estirpes que constituíram os perfis RA11 e RA12 que se revelaram também resistentes a claritromicina, e nos resistotipos RA20, RA22 e RA23, a eritromicina enquanto que no perfil RA9 foi também registada uma estirpe resistente a ampicilina e a tetraciclina.

O perfil RA23 está representado por uma estirpe de *C. jejuni* II, que foi a única que exibiu multi-resistência a todos os antibióticos testados.

É interessante constatar que todas as estirpes com multi-resistência referidas nos parágrafos acima são também resistentes as duas quinolonas (TABELA 2.15).

Nas amostras de Angola a resistência aos macrólidos foi registada em 6 (9,0%) estirpes das quais 2 (33,3%) foram resistentes a claritromicina e 3 (50%) a eritromicina, enquanto que 16,7% delas mostraram-se resistentes a ambos os antibióticos.

Estes resultados confirmam o facto de que as estirpes de *Campylobacter coli* são mais resistentes que as de *C. jejuni*, como já foi demonstrado por alguns autores como Wang *et al.* (1984); Taylor *et al.* (1987) e Reina *et al.* (1994).

A TABELA 2.16 apresenta as estirpes de Portugal cujo agrupamento por perfis de susceptibilidade permitiu definir 22 resistotipos ou antibiótipos, sendo o perfil RP12 com 19,7% (15/76) o que mais estirpes agrupa, seguido dos perfis RP14 com 11 (14,5%) e RP4 com 10 (13,2%) estirpes enquanto que os restantes perfis foram representados por números que variam entre 1 e 6 estirpes cada.

Na maioria dos perfis encontrados nesta tabela tais como RP1, RP2, RP3, RP6, RP8, RP10, RP12, RP13, RP14, RP16, RP18, e RP19, e que na sua totalidade englobam 68,4% (52/76) das estirpes analisadas que são de proveniência portuguesa, não foi encontrada nenhuma estirpe resistente aos antibióticos em estudo.

Contrariamente ao que aconteceu com as estirpes da proveniência angolana, verificou-se que, de todas as estirpes resistentes às quinolonas, apenas 4 ou cerca de 5,3%, também pertencentes ao biótipo I da espécie *C. jejuni* revelaram uma resistência cruzada para ambos os antibióticos enquanto que 14 (18,4%) foram resistentes ou ao ácido nalidíxico ou à ciprofloxacina. As taxas de resistência obtidas para o ácido nalidíxico e a ciprofloxacina foram de 22,4% (17/76) e 10,5% (8/76), respectivamente.

A resistência cruzada entre as quinolonas e outros antibióticos nas estirpes isoladas em Portugal foi identificada nos perfis RP21 e RP22 (TABELA 2.16), particularmente com os macrólidos (eritromicina e claritromicina).

É de salientar o registo do tipo RP21 que embora representado por uma única estirpe, é o segundo grupo com estirpe resistente a mais antibióticos (3), após o agrupamento RP22 que detém a multi-resistência em quase todos (6/7) os agentes antimicrobianos em estudo.

Este facto contrasta com os resultados obtidos com as estirpes de Angola neste ensaio com os antibióticos (TABELA 2.15), assim como por alguns investigadores (Wang *et al.*, 1984; Taylor *et al.*, 1987; Reina *et al.*, 1994).

Ainda em relação a eritromicina e claritromicina, além dos dois casos referidos num dos parágrafos anteriores, as restantes estirpes foram sensíveis ou de resistência intermédia, podendo verificar-se na TABELA 2.16 uma clara predominância da susceptibilidade intermédia em relação a eritromicina que atingiu 92,1% (70/76) enquanto que a claritromicina ficou-se nos 44,7% (34/76).

Tipos	Eritro	Clari	Ampi	Estrep	Tetra	NAL	Cipro	N.º estirpes	<i>C. coli</i>		<i>C. jejuni</i>		
									I	II	I	II	III
RP1	I	I	I	S	S	S	S	6	1		5		
RP2	I	I	I	S	S	I	I	3			3		
RP3	I	I	I	S	I	I	S	4			4		
RP4	I	I	I	S	I	R	S	10			10		
RP5	I	I	I	S	S	R	R	4			4		
RP6	I	I	S	S	S	S	S	2			2		
RP7	I	I	S	S	S	S	R	1			1		
RP8	I	I	S	S	S	I	S	3	1		2		
RP9	I	I	S	R	S	I	S	1	1				
RP10	I	S	I	S	S	S	S	1	1				
RP11	I	S	I	S	S	I	R	3	1		2		
RP12	I	S	S	S	S	I	S	15	2		13		
RP13	I	S	S	S	I	I	I	1			1		
RP14	I	S	S	S	I	I	S	11			9	2	
RP15	I	S	S	S	I	R	S	1			1		
RP16	I	S	S	S	S	S	S	4			3	1	
RP17	I	S	S	R	S	I	S	1			1		
RP18	S	S	S	S	S	I	S	1			1		
RP19	S	S	S	S	S	S	S	1	1				
RP20	S	S	S	R	S	S	S	1					1
RP21	R	R	I	S	I	R	S	1			1		
RP22	R	R	R	R	R	R	S	1			1		

TABELA 2.16:
Resistotipos obtidos com as estirpes de *Campylobacter* spp. isoladas em Portugal.

Eritro.: Eritromicina, Clari.: Claritromicina, Amp: Ampicilina, Estrep: Estreptomicina, Oxit: Oxitetraciclina, Nal.: Ácido Nalidíxico, Cipro.: Ciprofloxacina. I: Intermédia; R: Resistente; S: Sensível.

Além do resistótipo RP22 representado por uma única estirpe de *C. jejuni* I, resistente a 6 dos 7 antibióticos (excepto a ciprofloxacina), outros casos de relevância na resistência cruzada podem ser observados em RP9, RP17 e RP20 da mesma tabela, sendo, representados por estirpes identificadas como *C. coli* I, *C. jejuni* I e *C. jejuni* III, respectivamente.

No entanto, analisando as 143 estirpes que fizeram parte deste estudo, foram definidos 40 resistotipos (TABELA 2.17) dos quais se destacam os perfis RM1 com 4,9% (7/143), RM2 e RM33 com 7,7% (11/143) cada, RM4 com 5,5% (8/143), RM10 com 8,4% (12/143), RM15 com 6,3% (9/143), RM26 com 7,0% (10/143) RM31 com 10,5% (15/143) estirpes, que são os grupos nos quais há maior distribuição, registando-se uma taxa total de 50,3% (72/143).

Mas, apesar de elevadas taxas de estirpes obtidas nestes resistotipos, em nenhum destes agrupamentos foram encontradas estirpes resistentes aos macrólidos (eritromicina e claritromicina).

Os resistotipos RM26 e RM33, por um lado e RM4 e RM15, também com elevadas taxas de isolados, são exclusivamente representados por estirpes de *C. jejuni* e *C. coli*, respectivamente.

Os restantes resistotipos com maior frequência, nomeadamente RM1, RM2 e RM31 são representados por estirpes de diferentes biótipos de ambas as espécies enquanto que o tipo RM10, foi o único constituído por todos os biótipos de ambas as espécies em estudo.

									N.º	C. coli		C. jejuni		
Tipos	Eritro	Clari	Ampi	Estrep	Tetra	NAL	Cipro	estirpes	I	II	I	II	III	
RM1				S	S	S	S	7	2		5			
RM 2				S	S	R	R	11	5	1	4	1		
RM 3			S	S	S	R	R	3	2			1		
RM 4		S		S	S	S	S	8	6	2				
RM 5		S		S	S	S	R	1	1					
RM 6		S		S	S	R		1	1					
RM 7		S	S	S	S	R	R	4	2	1		1		
RM 8		S	S	S	S	R	R	4	4					
RM 9		S	R	S	S	R	R	1	1					
RM 10		S	S	S	S	S	S	12	5	1	3	2	1	
RM 11		R		S	S	R	R	1			1			
RM 12		R	S	S	S	R	R	1	1					
RM 13	S	S	S	S	S	S	S	7	6			1		
RM 14	S	S	S	S	S	S		1		1				
RM 15	S	S	S	S	S	R	R	9	9					
RM 16	S	S		S	S	S	R	1	1					
RM 17	S	S		S	S	R	R	3	2			1		
RM 18	S		S	S	S		S	1	1					
RM 19	S	S		S	S	S	S	3	1	1		1		
RM 20	R		S	S	S	R	R	1	1					
RM 21	R		S	S		S	S	1	1					
RM 22	R		S	S		R	R	1				1		
RM 23	R	R	R	R	R	R	R	1	1					
RM 24				S	S			3			3			
RM 25				S			S	4			4			
RM 26				S		R	S	10			10			
RM 27			S	S	S	S	R	1			1			
RM 28			S	S	S		S	3	1		2			
RM 29			S	R	S		S	1	1					
RM 30		S		S	S		R	3	1		2			
RM 31		S	S	S	S		S	15	2		13			
RM 32		S	S	S				1			1			
RM 33		S	S	S			S	11			9	2		
RM 34			S	S	S	S	S	2			2			
RM 35		S	S	S		R	S	1			1			
RM 36		S	S	R	S		S	1			1			
RM 37	S	S	S	S	S		S	1			1			
RM 38	S	S	S	R	S	S	S	1					1	
RM 39	R	R		S		R	S	1				1		
RM 40	R	R	R	R	R	R	S	1				1		

TABELA 2.17:
Resistotipos obtidos com as estirpes de Angola e Portugal.

Eritro.: Eritromicina, Clari. Claritromicina, Amp: Ampicilina, Estrep: Estreptomicina, Tetra: Oxitetramicina, NAL: Ácido Nalidíxico, Cipro.: Ciprofloxacina; I: Intermédia, R: Resistente; S: Sensível.

A taxa de 4,2% (6/143) de estirpes resistentes a eritromicina encontrada entre os isolados das duas origens pode, de certo modo, ser considerada elevada se tivermos em conta os resultados obtidos por alguns autores.

Neste caso, destaca-se o trabalho de Lekowska-Kochaniak *et al.* (1996) que, relacionado com a resistência aos antibióticos, não relata nenhum caso de resistência a eritromicina entre as 52 estirpes de *Campylobacter* spp. isoladas de produtos avícolas analisados que foram testadas.

Por outro lado, Gomes *et al.* (1996), ao analisar 238 isolados destas bactérias obtidos de fezes de frangos provenientes de uma unidade de produção avícola em Portugal, obtiveram apenas 0,4% de estirpes resistentes a eritromicina.

O uso de certos macrólidos como a espiramicina e a tilosina como suplemento alimentar de alguns animais como suínos e frangos, respectivamente pode propiciar a ocorrência de situações de resistências cruzadas entre antibióticos desta família nas estirpes de *Campylobacter* spp..

No trabalho aqui apresentado foram detectados 5,6% (8/143) das estirpes resistentes aos macrólidos, dos quais 37,5% (3/8) apresentam uma resistência cruzada a ambos os antibióticos desta família.

A TABELA 2.17 mostra ainda que todas as estirpes resistentes aos macrólidos, com exceção de apenas uma que se encontra no tipo RM21, foram também resistentes a pelo menos uma das quinolonas testadas ao longo deste trabalho.

Mas, sabe-se que apesar das diferenças nos mecanismos de resistência que caracterizam cada uma das duas classes de antibióticos, esta tendência ocorre e tem sido observada por muitos autores (Reina *et al.*, 1995; Sanchez *et al.*, 1994) entre as estirpes de *Campylobacter* spp..

Com a ampicilina, foram detectadas 3 (2,1%) estirpes resistentes, sendo uma de *C. jejuni* I e as duas outras de *C. coli* I. Esta taxa pode ser considerada muito baixa em comparação com outras como as de 5,5%, 51,4% e 55% das estirpes isoladas de amostras de frangos por Cabrita *et al.* (1992b), Reina *et al.* (1994) e Sáenz *et al.* (2000), respectivamente.

Os resultados obtidos neste estudo, foram ligeiramente superiores a taxa de 3,7% obtidos por Cabrita *et al.* (1992b) mas inferiores aos 5,5% de estirpes resistentes detectadas ainda em Portugal nas amostras de frangos (Cabrita *et al.*, 1992a). Para este antibiótico, foi registada uma sensibilidade na ordem de 58,1% (83 /143) das estirpes enquanto que 39,9% (57/143) estirpes apresentaram valores de sensibilidade intermédia.

No que concerne a estreptomicina, as estirpes resistentes identificadas pertenceram a *C. jejuni* I, *C. jejuni* II, *C. jejuni* III e *C. coli* I, com uma prevalência de 20% (1/5) para todos estes biotipos.

De certo modo, estes resultados contrastam com os dados de Sáenz *et al.* (2000) e Reina *et al.* (1995), que observaram maior nível de resistência nas estirpes de *C. coli* do que nas de *C. jejuni*. Outros investigadores, como Cabrita *et al.* (1992b), detectaram uma baixa prevalência da mesma, tendo-se registado uma taxa elevada de até 23,5% de estirpes resistentes isoladas da totalidade das amostras analisadas, enquanto que estirpes provenientes de amostras de frangos não exibiram nenhuma resistência a este antibiótico.

Foi notório a elevada frequência de sensibilidade das estirpes perante a estreptomicina e a oxitetraciclina, cujos valores obtidos foram, 96,5% (138/143) e 76,9% (110/143), respectivamente. Por outro lado, a resistência das estirpes a estes antibióticos ficou nos 3,5% (5/143) e 2,1% (3/143), respectivamente.

Relativamente a estreptomicina, e apesar de alguns autores como Cabrita *et al.* (1992a) e Gomes *et al.* (1996) terem encontrado 8,3 e 8,5% de estirpes resistentes a este antibiótico na totalidade de estirpes por eles analisadas, amostras de origem avícola dos mesmos estudos realizados pelo segundo grupo de autores acima referidos, revelaram-se isentas de estirpes resistentes a este agente antimicrobiano.

Quanto a tetraciclina, duas das três estirpes identificadas como resistentes a este antibiótico foram da espécie *C. coli* do biótipo I enquanto que a outra, também do biótipo I mas da espécie *C. jejuni*. Apesar de ligeiramente inferior à taxa de 2,7% encontrada por Cabrita *et al.* (1992a), o nível de resistência de 2,1% detectado para a tetraciclina ao longo deste estudo revelou-se duas vezes inferior à taxa de 5,5% que Cabrita *et al.* (1992b) obtiveram de estirpes isoladas das amostras de animais selvagens e domésticos em Portugal.

No entanto, níveis ainda mais elevados foram relatados por outros investigadores como Reina *et al.* (1994), que obtiveram 21,2% de resistência a este antibiótico.

Os resultados obtidos no decurso deste trabalho indicam ainda que duas ou 66,7% das estirpes resistentes a tetraciclina pertencem à espécie *C. coli*, enquanto que a outra foi identificada como *C. jejuni*. A tendência de que as taxas de resistência a este agente antimicrobiano podem variar de acordo com as espécies, como foi relatado por alguns autores (Sagara *et al.*, 1987; Reina *et al.* 1994) foi observada nos resultados obtidos na presente pesquisa (TABELAS 2.15, 2.16 e 2.17).

Geralmente, as quinolonas revelam-se muito activas nas estirpes de *Campylobacter* spp. como é observado em maioria dos trabalhos realizados por diferentes investigadores (Harnett *et al.*, 1995; Saénz *et al.*, 2000).

No presente estudo, foram registados números consideravelmente elevados de estirpes resistentes a estes antibióticos que foram 54/143 ou sejam 37,8% e 42/143 ou sejam 29,4%, para o ácido nalidíxico e a ciprofloxacina, respectivamente. Estes valores ultrapassam as taxas de 27,2 e 24,2% obtidas por Reina *et al.* (1994) para estes antibióticos, respectivamente. Mas a co-resistência verificada entre estes antibióticos nas estirpes estudadas por os mesmos autore atingiu 88,1%.

Este valor supera de forma notória os 25,2% (36/143) das estirpes com resistência cruzada para estes antibióticos, registados no decurso deste trabalho, dos quais 25% (16/36) foram da espécie de *C. jejuni* enquanto que as restantes estirpes ou 75% (27/36) pertencem a *C. coli*. Entretanto, apenas uma estirpe pertencente ao biótipo I de *C. jejuni* revelou-se susceptível ao ácido nalidíxico mas resistente a ciprofloxacina.

No entanto, num estudo realizado por Li *et al.* (1998), nenhuma estirpe susceptível a ácido nalidíxico foi resistente a ciprofloxacina, tendo encontrado 66% de estirpes co-resistentes entre ambas as quinolonas. Mas, essas elevadas taxas de resistências às quinolonas obtidas por alguns autores contrastam com os resultados de estudo realizados por Cabrita *et al.* (1992a), que não detectaram nenhuma estirpe resistente a estes antibióticos nas amostras de fezes de indivíduos com gastroenterites, e por Gaunt & Piddock (1996) que das 20 estirpes isoladas de carcassas de frangos no Reino Unido, apenas uma foi resistente a ciprofloxacina.

A emergência e o aumento de estirpes multi-resistentes, particularmente aos macrólidos e às quinolonas, constituem um risco indesejável para a saúde pública, dado que os antibióticos de ambas as classes são frequentemente utilizados como agentes antimicrobianos de primeira e segunda linha no tratamento de infecções provocadas por *Campylobacter* spp (Engberg, *et al.*, 2001).

Infelizmente, além de muitos casos relacionados com estes antibióticos, outras combinações de co-resistência nas estirpes de *Campylobacter* spp. ou outras bactérias enteropatogénicas têm sido frequentemente relatados entre diferentes antibióticos de igual modo como aconteceu também neste ensaio (TABELA 2.17).

Deste modo, Reina *et al.* (1995) observaram que 6,1% das estirpes analisadas foram simultaneamente resistentes a eritromicina e a quinolonas, enquanto que todas as estirpes (5,59%), com a excepção de uma, identificadas como resistentes a eritromicina neste trabalho, foram também resistentes a pelo menos uma das quinolonas testadas. Mas esta tendência não foi confirmada por Murphy *et al.* (1996) que obtiveram 79% das estirpes resistentes a ciprofloxacina mas que foram todas susceptíveis a azitromicina, um antibiótico da família dos macrólidos.

O uso das fluoroquinolonas na medicina veterinária e humana, particularmente no tratamento das doenças respiratórias, assim como a sua utilização como segunda linha no tratamento contra as estirpes multi-resistentes, entre as quais contam-se as bactérias responsáveis pela tuberculose, constitui um perigo eminente para a saúde pública, pois são geralmente considerados como as principais vias de surgimento e de aumento das estirpes resistentes.

“DEVEMOS APRENDER A FAZER BALAS MÁGICAS QUE NÃO FALHEM O SEU ALVO, MAS QUE DESTRUAM APENAS OS GERMES CONTRA OS QUAIS SÃO DISPARADAS” (ERLICH, 1909).

2.4. CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos com a susceptibilidade das 143 estirpes de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* aos 7 antibióticos analisados pode-se concluir que:

- A introdução das fluoroquinolonas como suplemento alimentar nos aviários e outras unidades de produção animal que começou em 1995, nos Estados Unidos da América tem sido considerado como o principal acto responsável pela emergência e a criação de reservatórios de estirpes resistentes de *C. jejuni* como referiram Smith *et al.* (1998), embora o uso indevido e abusivo de certos antibióticos possa também contribuir consideravelmente em certas situações.
- O uso da flumequina como suplemento alimentar no caso das estirpes de origem angolana deve ser considerado como provável motivo de elevada taxa de estirpes resistentes às quinolonas testadas neste trabalho.
- O nível relativamente alto de resistência às quinolonas entre as estirpes isoladas em Portugal pode estar relacionado com o uso de algumas fluoroquinolonas, como a enrofloxacina, na produção e clínica veterinárias.
- A presença de estirpes resistentes aos macrólidos, como a eritromicina e a claritromicina, tem a sua razão de existir devido à introdução de tilosina e virginiamicina como suplemento alimentar nas rações animais, e no caso particular de frango, o uso comum da espiramicina é provavelmente responsável por esta situação.
- Apesar das taxas de prevalência de estirpes resistentes a eritromicina obtidas neste trabalho serem relativamente altas, pensa-se que este antibiótico pode ainda manter o estatuto da primeira escolha que tem para o tratamento das infecções provocadas pela campilobacteriose.
- Por outro lado, deve ser revista a legislação que regulamenta o uso de antibióticos não só na veterinária, mas também e sobretudo na medicina humana, onde medidas eficazes devem ser tomadas afim de evitar a emergência e a proliferação de estirpes resistentes.
- No caso de Angola, é particularmente importante que as autoridades tomem as medidas adequadas que regulamentem a actividade farmacêutica no país, considerando-se que o estado actual, no que toca o uso e a comercialização dos medicamentos, particularmente os antibióticos, é um verdadeiro atentado à saúde pública.
- Por outro lado, não deixa de ser verdade que o uso inadequado dos antibióticos em todas as suas formas constitui um perigo iminente em saúde pública.

PARTE III

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS DE CAMPYLOBACTER

INTRODUÇÃO GERAL

Na Sistemática, os processos de identificação dos organismos são o resultado final da taxonomia que permitem colocar os isolados ou estirpes, de acordo com as suas características, em grupos taxonómicos apropriados numa classificação previamente existente. Portanto, a identificação é um processo comparativo pelo qual organismos desconhecidos são examinados e comparados com os outros já conhecidos (Sneath, 1978, citado por Priest e Austin, 1993). Por seu turno, a tipificação tem como propósito a caracterização de um grupo, permitindo a sua diferenciação de todos os outros. Este processo é sobretudo muito importante para os estudos epidemiológicos e biotecnológicos.

Para atingir os seus propósitos, os processos de identificação e tipificação passam pela aplicação de métodos apropriados que permitem obter as informações necessárias sobre os organismos. Quando os caracteres utilizados são bioquímicos, fisiológicos ou morfológicos os métodos são fenotípicos e quando os caracteres se referem aos ácidos nucleicos (DNA, ou RNA), são genotípicos ou moleculares.

Mas, o potencial dos métodos de identificação e/ou tipificação é avaliado com base nas informações que cada um pode fornecer sobre as estirpes em estudo. Por isso, atendendo ao rigor da padronização dos métodos utilizados e à natureza (quantidade ou qualidade) de informação obtida, a classificação, a identificação e a diferenciação das estirpes, podem ser alcançadas sob diversos pontos de vista ou abordagens. O poder de tipificação, a capacidade de discriminação das estirpes, a reprodutibilidade e a sensibilidade dos métodos estão entre os parâmetros que geralmente podem ser utilizados na sua avaliação.

Assim, um método de identificação ou de tipificação é tido como eficaz quando é habilitado para tipificar todas ou quase todas as estirpes em estudo. Por isso, quanto maior for o número de estirpes tipificadas, maior é o seu poder de tipificação.

Em princípio, um bom método de tipificação (ou identificação) deve ser capaz de tipificar (ou identificar) todos os organismos pertencentes a uma determinada espécie. Neste aspecto os métodos moleculares, por estarem baseados em marcadores geralmente considerados estáveis, têm mais vantagens que os métodos fenotípicos tais como aqueles que se baseiam numa reacção com um anticorpo (serotipagem), a presença de receptores do bacteriófago (fagotipagem) e/ou de muitas outras substâncias químicas tais como as proteínas ou ácidos gordos que podem não estar presentes em todos os membros da espécie (Olive & Bean, 1999; Klena, 2001). Deste modo, os métodos moleculares permitem evitar a dependência das características fenotípicas expressas e muitas vezes variáveis (Hernandez et al., 1995).

A capacidade de diferenciar ou discriminar as estirpes não relacionadas é uma abordagem importante na avaliação dos métodos de tipificação. Em princípio, estirpes de proveniências diferentes devem ter perfis característicos diferentes, pelo que um bom método de tipificação deve ter uma maior capacidade de discriminá-las. Mas, estes métodos devem também ter a capacidade de demonstrar a afinidade entre estirpes idênticas ou ainda isoladas da mesma fonte infecciosa ou ambiental. Um método com um elevado poder de diferenciação pode ser poderoso e elegível para a tipificação de estirpes ao nível infra-específico (Olive & Bean, 1999).

Por esta razão, do ponto de vista epidemiológico, e atendendo á importância e ao papel de *C. jejuni* e *C. coli* nas doenças diarreicas do homem, o processo de diferenciação das estirpes de ambas espécies é muito importante, pois permite: (i) a caracterização dos surtos que estas espécies provocam; (ii) a detecção das transmissões cruzadas das infecções hospitalares; (iii) a determinação das fontes de infecção; e (iv) o reconhecimento das estirpes particularmente virulentas, sendo ainda esta, a solução para as respostas rápidas e eficazes que actualmente se exige nas diversas questões que se colocam, quer no que toca as análises clínicas e os estudos epidemiológicos, quer na resolução de problemas relacionados com a identificação, tipificação ou mesmo com sistemática dos organismos, em geral.

A reprodutibilidade de um método relaciona-se com a capacidade que ele tem de produzir os mesmos resultados quando uma estirpe particular é repetidamente testada. Este aspecto é muito importante porque permite construir bancos de dados seguros, permitindo a sua futura utilização na comparação com as estirpes desconhecidas para a classificação ou caracterização.

E, os métodos genotípicos, por estarem baseados em caracteres estáveis parecem melhor colocados para apresentar uma excelente senão boa reprodutibilidade. No entanto, sabe-se que vários factores têm contribuído para uma baixa reprodutibilidade dos métodos entre os quais constam as condições da experiência, a variação da expressão de caracteres, o erro humano etc, (Lübeck *et al.*, 2003).

A interpretação dos resultados obtidos nos processos de electroforese não é uma tarefa fácil, até porque certos métodos genotípicos como a análise de macrorestrição por PFGE (pulsed field gel electrophoresis) produzem padrões de bandas muito complexos. As dificuldades de execução de uma técnica, os custos e o tempo requeridos para obter resultados devem ser avaliados na escolha de um método que se adequa aos objectivos do estudo (Olive & Bean, 1999)

Os métodos fenotípicos, particularmente em espécies termófilas como *C. jejuni* e *C. coli*, têm-se revelado muito inconsistentes, sendo por isso limitados na discriminação dos isolados, quer a nível de espécie, de subespécie e/ou mesmo de estirpe.

No entanto, dado as necessidades cada vez maiores de resolver os problemas taxonómicos e epidemiológicos relacionados com *Campylobacter*, a aplicabilidade dos métodos fenotípicos tem-se tornado restritiva, pois a suas falhas reflectem-se no grau de tipificação e poder de discriminação de estirpes, assim como na reprodutibilidade dos mesmos, comprometendo desta maneira o seu valor quer do ponto de vista taxonómico, quer epidemiológico (Olive & Bean, 1999; Wassenaar & Newell, 2000).

Em busca de alternativas, foram ainda desenvolvidos métodos que propiciam informações obtidas através de estudos relacionados com os caracteres químicos dos organismos e que consistem na utilização de variações químicas de algumas substâncias tais como as proteínas, os ácidos gordos da membrana celular, etc.

De facto, estes métodos vieram aumentar o espectro e o fluxo de dados informativos necessários para a identificação e a classificação dos microrganismos, dando origem e corpo aos conceitos teóricos denominados quimiosistemática ou quimiotaxonomia e definidos como estudo de variações químicas em organismos vivos e o uso destes caracteres como ferramentas para a classificação e identificação. Os dados quimiotaxonómicos são fundamentalmente considerados como um reflexo mais aproximado do genoma bacteriano que os dos dados baseados em caracteres morfológicos, gerando classificações mais seguras dos organismos. Por isso, os dados quimiotaxonómicos são vistos como um potencial suplemento das abordagens tradicionais para a identificação dos organismos (Priest & Austin, 1993).

Na tentativa de superar a maioria das inconsistências encontradas em diferentes tipos de métodos fenotípicos, métodos baseados em caracteres genómicos foram desenvolvidos e a sua aplicação na identificação e/ou tipificação das estirpes bacterianas constitui uma potencial ferramenta para os estudos taxonómicos e as investigações epidemiológicas (Wassenaar & Newell, 2000).

Em geral, a identificação ou tipificação das bactérias, a partir das características genéticas pode ser considerado um processo seguro e vantajoso, uma vez que este processo recorre aos métodos que se baseiam em caracteres (DNA ou RNA) que podem ser considerados estáveis¹ e que permitem obter um perfil característico individual de cada isolado, sendo possível reconhecer estirpes idênticas e distinguir estirpes diferentes.

Adicionalmente, a sua universalidade de aplicação a todas as estirpes coloca-os em posição muito mais vantajosa que os métodos fenotípicos.

¹ Devido a troca de genes e a transferência de plasmídios que muitas vezes se verificam nos organismos procariotas, seria menos prudente considerar o DNA como uma estrutura estável. Entretanto, em comparação com os métodos fenotípicos as técnicas baseadas em análise de DNA são mais estáveis.

Em estudos de *Campylobacter*, a aplicação dos métodos moleculares trouxe muitos benefícios que permitiram esclarecer as inúmeras dúvidas sobre a verdadeira posição taxonómica do grupo. Por outro lado, dado a importância das estirpes de algumas espécies deste género nas gastroenterites, particularmente humanas, que obriga a conhecimentos mais aprofundados deste grupo de microrganismos, estes métodos constituem uma mais valia e têm contribuído de forma eficaz na caracterização destas bactérias.

Uma identificação cuidadosa das estirpes de *C. jejuni* e *C. coli* fornece dados importantes para a vigilância sanitária e estudos de riscos de saneamento sobre os quais podem ser baseadas as intervenções estratégicas para a saúde pública. Por isso, tornou-se urgente encontrar métodos de tipificação capazes de permitir o reconhecimento de surtos de infecções, a determinação das fontes de infecções, a detecção das transmissões cruzadas dos agentes patogénicos nas infecções hospitalares ou nosocomiais, o reconhecimento de estirpes particularmente virulentas entre microrganismos e a monitorização dos programas de vacinação (Olive & Bean, 1999).

Portanto, a compreensão das características epidemiológicas das infecções causadas por *Campylobacter*, em especial por *C. jejuni* e *C. coli*, depende da capacidade que os métodos têm para discriminar dentro das espécies, distinguindo estirpes de fontes diferentes (Patton *et al.* 1991), ao mesmo tempo que identificam duas estirpes semelhantes.

A tipificação é um processo muito importante para a epidemiologia. Ela constitui uma potente ferramenta que permite reconhecer os surtos das infecções e os organismos patogénicos particularmente envolvidos.

Muitos estudos têm demonstrado a existência de uma grande diversidade genómica entre estirpes de *C. jejuni* e *C. coli* provenientes de fontes e ambientes diversos (hospedeiros humanos e animais, alimentos, meio ambiente, etc.) onde estas bactérias são frequentemente isoladas.

Noutras espécies de *Campylobacter*, esta diversidade genética foi relatada por Stanley *et al.* (1992) e Endetz *et al.* (1997) que isolaram estas bactérias dos humanos, cães e ostras, tendo utilizado as técnicas de ribotipagem e RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).

Em *Campylobacter*, os primeiros estudos de tipificação baseados em análise genómica foram direccionados para os estudos epidemiológicos e de surtos em bandos de frangos. Mas, mais recentemente, verifica-se uma certa escassez de relatos de casos esporádicos de infecções, quer dos humanos, quer de fontes animais, em relação a estes métodos (Nielsen *et al.* 2000).

Devido a sua capacidade de discriminar entre estirpes não relacionadas, mesmo quando pertencem a mesma espécie, certas técnicas genotípicas tais como, ribotipagem, análise de macrorestrição por PFGE, *flaA*-PCR e RAPD têm sido utilizadas para identificar estirpes relacionadas com as infecções, contribuindo de forma valiosa para as investigações dos surtos provocados pelas estirpes de *Campylobacter* spp..

Segundo Brenner *et al.* (1982), as informações de afinidade baseadas no DNA podem ser consideradas suficientes para identificar os organismos ao nível de espécie, mesmo quando não estão disponíveis os dados fenotípicos.

Assim, com a aplicação de métodos de restrição de DNA cromossómico em *C. jejuni* e *C. coli*, Owen (1989) conseguiu diferenciar estirpes produtoras e não produtoras de ácido sulfídrico. Esta análise permitiu ainda a discriminação entre estirpes de *C. jejuni* pertencentes aos biótipo III e IV. Estes métodos têm a capacidade de distinguir estirpes de diferentes serótipos, ao mesmo tempo que são capazes de demonstrar que estirpes do mesmo serótipo podem exhibir elevado grau de similaridade.

A análise por hibridação DNA-DNA das estirpes com a estirpe-tipo é considerada um método ideal para a confirmação de uma identificação positiva das espécies de *Campylobacter*, como é o caso das estirpes de *C. jejuni* nas quais o resultado da prova de hidrólise de hipurato de sódio se revela negativo (Totten *et al.*, 1987).

No entanto, este método é execução pouco expedita, pelo que a sua aplicação como teste de rotina se torna difícil. Por isso, diferentes sondas foram projectadas e desenvolvidas para identificar e tipificar as estirpes de *C. jejuni* e *C. coli* (Taylor & Hiratsuka, 1990; Olive *et al.*, 1990). Utilizando como sonda um fragmento de 1.8 kb de DNA, relacionado com o gene que codifica para uma proteína da membrana externa, Korolik *et al.* (1995) conseguiram classificar 169 estirpes de *C. jejuni* e *C. coli*, demonstrando que esta sonda era mais específica que todas as outras anteriormente desenvolvidas.

Segundo Uyttendaele *et al.* (1994), o método de NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) em que a amplificação do ácido nucleico (RNA) se realiza pela acção combinada da transcriptase reversa do vírus da mieloblastose, T7 polimerase de RNA e RNase H, é também utilizado para identificar as espécies de *Campylobacter*. Ao contrario do PCR normal, esta técnica é executada isotermicamente sem recorrer a um termociclador especializado.

No entanto, Ng *et al.* (1987), pelo método de hibridação "slot blot", demonstraram que estirpes de *Campylobacter* spp. consideradas termófilas atípicas podem ser devidamente identificadas como *C. jejuni* e *C. coli*, ou mesmo atribuídas a outras espécies.

As estirpes de *Campylobacter* spp. podem ainda ser identificadas utilizando métodos baseados na digestão de DNA genómico (DNA cromossómico e plasmídeos). Entre os métodos baseados na análise de padrões de restrição produzidos por enzimas de corte de alta frequência distinguem-se: REA (Restriction Endonuclease Analysis), BRENDA ou GDD (Genomic DNA Digest).

Em *Campylobacter*, devido às limitações reveladas na aplicação dos métodos fenotípicos, a técnica de REA foi utilizada para identificar diversas espécies além de *C. jejuni* e *C. coli*. Por isso, o uso de determinadas enzimas tais como *EcoRI*, *HaeIII*, *HindIII*, *BstII* e *XhoI* tem demonstrado a estabilidade dos padrões, fornecendo um meio potencialmente sensível para a diferenciação das estirpes (Owen *et al.*, 1989).

No entanto, embora sejam utilizados em conjuntos limitados de estirpes, a análise e interpretação sempre complicadas devido aos complexos padrões de DNA produzidos limitam de forma geral a disponibilidade destas técnicas para a tipificação (Owen 1989).

Por isso, as técnicas de macrorestrição baseadas na digestão do DNA genómico com a utilização de enzimas de restrição de corte não frequente foram desenvolvidas como alternativa com objectivo de simplificar os métodos acima referidos. No entanto, apesar de existirem várias técnicas de macrorestrição, em *Campylobacter*, e tal como noutras espécies bacterianas, a separação dos fragmentos de macrorestrição por PFGE é a mais frequentemente utilizada (Klena, 2001). A técnica de PFGE tornou-se assim numa ferramenta útil para a análise das estirpes bacterianas, tendo como potencialidade a sua capacidade de separar fragmentos de DNA de maior peso molecular (de 20 a >400 kb), com uma elevada resolução.

O método tem sido utilizado tanto para a identificação como para tipificação das estirpes de *Campylobacter* spp. Os primeiros estudos remontam do início da década passada e foram realizados com as estirpes de *C. jejuni* e *C. coli* (Yan *et al.*, 1991). Mas, o estudo de cada uma destas espécies foi completado pelos mesmos autores com a hibridação baseada na técnica de ribotipagem (rRNA 16S).

A técnica de PFGE permite também uma discriminação das estirpes de *Campylobacter* spp. ao nível infra-específico, pois segundo Lorenz *et al.* (1998), a utilização deste método na tipificação das estirpes de *C. jejuni* permitiu a identificação dos serotipos de Penner 9, 38 e 63 que foram isoladas dos humanos, animais e água, respectivamente.

Por outro lado, numa análise genómica por PFGE, Fujita *et al.* (1995) obtiveram 18 perfis distintos entre 21 isolados de *C. fetus* além de terem conseguido diferenciar duas estirpes da mesma colecção entre as subespécies *C. fetus* subsp. *fetus* e *C. fetus* subsp. *venerealis*.

Os perfis de PFGE variam com as condições de cada ensaio, que por sua vez depende da natureza e do número de enzimas utilizadas, sendo por isso, responsáveis pela determinação do poder de discriminação desta técnica. Por outro lado, as variações nas condições de electroforese constituem um factor importante que influencia a reprodutibilidade inter-laboratorial deste método. Assim sendo, na tipificação das estirpes de *C. upsaliensis* por PFGE, Bourke *et al.* (1996), utilizando a enzima *XhoI* obtiveram resultados muito encorajadores que demonstraram a heterogeneidade genotípica desta espécie de *Campylobacter*.

Contudo, os dados obtidos na aplicação do método de PFGE devem ser tratados com cautela, uma vez que a instabilidade genómica inerente aos rearranjos intra-moleculares espontâneos nestas bactérias pode também estar na origem das variações genéticas capazes de alterar os perfis de restrição de PFGE das estirpes de *C. jejuni* e *C. coli* (Wassenaar *et al.*, 1998; On, 1998).

Por isso, apesar da referência feita por Olive & Bean (1999) em relação aos organismos em geral, a análise de DNA cromossómico total por PFGE não deve ser considerada um padrão ("Gold Standard Methods") entre os métodos moleculares utilizados na tipificação das estirpes de *Campylobacter* spp. (Harrington *et al.*, 1997; Wassenaar *et al.*, 1998).

No entanto, a produção de DNase por estirpes de *Campylobacter*, que tem sido apontada como uma das dificuldades na aplicação do método para estas bactérias, segundo Gibson *et al.* (1994) pode ser ultrapassada por pré-tratamento com formaldeído.

Por seu turno, a análise por AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) é considerada uma técnica de "fingerprinting" baseada na amplificação de um subconjunto de fragmentos de DNA cromossómico gerados por enzimas de restrição (Vos *et al.* 1995).

Das variantes existentes deste método, a versão mais utilizada inclui duas enzimas com locais de reconhecimento de dimensões diferentes (uma com 4 bp e a outra com 6 bp) e dois "primers" de amplificação.

Embora inicialmente desenvolvido e descrito para estudo de plantas, o método de análise por AFLP começou a ser adaptado nos organismos bacterianos com a identificação de *Acinetobacter baumannii* (Koeleman *et al.*, 1998) e a tipificação das estirpes de *Helicobacter pylori* (Gibson *et al.*, 1998).

No entanto, apesar dos bons resultados obtidos na sua aplicação em diferentes grupos bacterianos, este método necessita ainda de uma padronização correspondente a cada espécie, quanto às enzimas de restrição e aos nucleótidos específicos adjacentes que são utilizados (Wassenaar & Newell, 2000).

Apesar da sua utilização em *Campylobacter* ser mencionada para a identificação de *C. jejuni* e *C. coli*, a análise genómica por AFLP tem provado também ser um excelente método na discriminação entre subespécies (Wassenaar & Newell, 2000).

Mais recentemente o método tem sido utilizado com sucesso na tipificação de estirpes deste género (Wittwer *et al.*, 2005; Fang *et al.*, 2006; Johnsen *et al.*, 2007). Porém, a complexidade e o custo muito elevado na aquisição de equipamentos constituem os principais factores que limitam a sua ampla utilização.

O operão *rrn* é uma fonte de marcadores genómicos de grande valor identificativo das espécies bacterianas (Owen, 1989) que se tornou num alvo seguro para a análise molecular das estirpes bacterianas (Wassenaar & Newell, 2000).

Com base nisso, perfis electroforéticos das estirpes bacterianas podem ser obtidos a partir de DNA genómico digerido e a seguir ser submetido a hibridação pela técnica de “Southern blot”, utilizando uma sonda específica para os genes ribossomais (Wassenaar & Newell, 2000).

A ribotipagem, como é denominado este método, detecta os polimorfismos de dimensão que são presentes nas espécies e subespécies de *Campylobacter*. Por isso, são necessárias sondas marcadas que se ligam aos fragmentos contendo as regiões complementares cuja detecção é feita por autoradiografia ou métodos químicos.

Segundo Taylor *et al.* (1992), devido à possibilidade de existência de três cópias do operão *rrn* que podem ser encontradas nas estirpes de *Campylobacter* spp. termófilas, a utilização das enzimas que não contêm um local de restrição dentro do operão resulta na detecção de 3 bandas, enquanto que a escolha de enzimas com pelo menos um local de reconhecimento permite a detecção de pelo menos 6 fragmentos.

Por isso, a concepção das sondas e a escolha das enzimas de restrição utilizadas na digestão do genoma bacteriano constituem os pontos fulcrais da técnica de ribotipagem (Klena, 2001). As primeiras sondas utilizadas no estudo de *Campylobacter* para uma análise por ribotipagem foram sintetizadas a partir de rRNA 16S e rRNA 23S e marcadas com a biotina ou substâncias radioactivas (Owen, 1989; Kiehlbauch *et al.*, 1991a).

As enzimas utilizadas na ribotipagem variam de acordo com os objectivos do estudo, podendo as enzimas *Pst*I, *Hae*III, *Hind*III, e *Pvu*II, ser utilizadas isoladamente, ou em combinações de duas ou três. Por isso, é sempre difícil estabelecer um quadro comparativo directo entre resultados obtidos nos estudos de ribotipagem de laboratórios diferentes que usaram enzimas e sondas diferentes (Wassenaar & Newell, 2000).

Os padrões da ribotipagem obtidos entre isolados de *Campylobacter* são geralmente utilizados para identificar as estirpes ao nível de espécies. Sendo também muito utilizada na tipificação das estirpes bacterianas, a ribotipagem tem sido eficaz para distinguir entre *C. fetus* subsp. *fetus* e *C. fetus* subsp. *venerealis* ou diferenciar estirpes dentro destas subespécies (Denes *et al.* 1997).

Embora exista uma correlação forte entre a técnica de ribotipagem e o método de hibridação de DNA genómico, estas técnicas diferem uma da outra pelo facto da ribotipagem analisar apenas uma pequena porção do genoma correspondente ao operão *rrn*.

A combinação da ribotipagem e REA foi utilizada para a diferenciação entre estirpes de *C. jejuni* subsp. *jejuni*, *C. jejuni* subsp. *doylei*, *C. coli*, *C. fetus*, *C. hyointestinalis* e *C. sputorum* (Owen *et al.*, 1989; Owen *et al.*, 1990). Apesar da ribotipagem possuir um maior poder de tipificação, no caso de *Campylobacter*, a sua capacidade de discriminação é muito limitada, pois a maioria das estirpes deste género, particularmente as termófilas, como já se referiu apresentam apenas três cópias de genes de rRNA.

Segundo Kiehlbauch *et al.* (1991b), esta técnica revelou-se muito mais útil para a identificação das espécies aerotolerantes de *Campylobacter* que pelos métodos fenotípicos mais dificilmente podem ser identificadas. Contudo, a técnica foi utilizada com sucesso na tipificação de algumas espécies como *C. jejuni*, *C. coli*, e *C. upsaliensis* (Goossens *et al.*, 1995; Stanley *et al.*, 1994), bem como *C. lari* (Owen *et al.*, 1993).

A diferenciação entre estirpes de *C. coli* e *C. jejuni* por ribotipagem, que muitas vezes tem sido problemática, pode ser resolvida por utilização simultânea de duas enzimas de restrição e uma sonda específica para rRNA 16S (Fitzgerald *et al.*, 1996). O complemento da técnica de ribotipagem com uma re-hibridação “Southern blot”, utilizando sondas direccionadas para outras regiões hipervariáveis do cromossoma é uma mais valia, porque aumenta os níveis de discriminação da técnica (Jackson *et al.*, 1996; 1997).

Na generalidade, para uma aplicação bem sucedida de qualquer método de identificação e tipificação é indispensável a estabilidade do marcador utilizado. Ao contrário do que acontece com muitos métodos fenotípicos tais como a serotipagem e biotipagem, os processos de repicagens sucessivas, congelação e conservação das estirpes de *Campylobacter* spp. não têm influenciado tanto os métodos moleculares.

Para evitar variações na expressão de marcadores, muitos protocolos de métodos de tipificação fenotípica recomendam a aplicação de várias repicagens das culturas para detectar de forma óptima esta expressão. No entanto, alguns estudos de *Campylobacter* através das técnicas de PFGE e *flaA*-PCR têm demonstrado que as repicagens múltiplas a longo termo podem estar na origem de variações nos padrões de bandas obtidos (On, 1998).

Isto prova a existência de uma certa instabilidade genómica nas estirpes de *Campylobacter* spp. que pode ser causada pelos seguintes processos: recombinação entre os genes duplicados da flagelina (*flaA* e *flaB*), transformação natural com DNA extra-celular e recombinação programada e aleatória ao nível genómico.

Em estudos de epidemiologia, as pequenas diferenças de perfis detectadas por RAPD entre estirpes de *Campylobacter* são muitas vezes consideradas como o resultado da instabilidade genômica destas bactérias. Mas alguns métodos como a macrorestrição por PFGE e a ribotipagem têm a capacidade de detectar a instabilidade genética das estirpes de *Campylobacter* spp. (Wassenaar & Newell, 2000).

Enquanto alguns investigadores sustentam a instabilidade genética para justificar as variações nos resultados obtidos nos perfis de bandas com aplicação de métodos como macrorestrição por PFGE, ribotipagem e RAPD, este último em menor escala, outros consideram as técnicas como AFLPs e PCR-Multiplex relativamente insensíveis a instabilidade genética (Hanninem *et al.* 1999).

Mais recentemente, e tendo em conta a maior acessibilidade e conteúdo informativo da sequenciação de DNA, a análise comparativa de sequências de diversos genes (MLST, “multilocus sequence typing”) tem também sido aplicada, com sucesso, na tipificação de estirpes de *Campylobacter* spp., permitindo, por exemplo, verificar a natureza clonal de isolados de *C. fetus* (van Bergen *et al.*, 2005) e avaliar a diversidade genética de isolados de *C. jejuni* (Kinana *et al.*, 2006) e de *C. coli* (Kinana *et al.*, 2007; Litrup *et al.*, 2007).

1.1. INTRODUÇÃO

Com o objectivo de diagnosticar de forma mais rápida e segura os microrganismos patogénicos como as estirpes de *Campylobacter* spp. termófilas, que frequentemente estão envolvidas em gastroenterites, têm sido desenvolvidos diversos métodos moleculares de identificação. Nos últimos anos, os métodos baseados na técnica de PCR têm demonstrado ser dos melhores e mais rápidos para a discriminação das espécies de *Campylobacter* (Linton *et al.*, 1997; Lawson *et al.*, 1998; Denis *et al.*, 1999; On & Jordan, 2003).

A identificação molecular das estirpes bacterianas tem-se mostrado importante para o diagnóstico clínico e epidemiológico. Deste modo, a análise das sequências de DNA permite a diferenciação entre as espécies termófilas, particularmente entre as espécies *C. jejuni* e *C. coli*. Por isso, no desenvolvimento destes métodos baseados em PCR foram desenhados e desenvolvidos “primers” específicos que flanqueiam, num processo de amplificação de DNA, as sequências correspondentes do DNA-molde.

Em *Campylobacter*, algumas destas sequências de DNA correspondentes aos genes que codificam para: (i) o rRNA 23S (rDNA 23S); (ii) a sub-unidade β da RNA polimerase (*rpoB*); (iii) a MapA, uma proteína associada a membrana interna (*mapA*); (iv) a sub-unidade de DNA gyrase (*gyrA*), (v) a GTPase; (vi) a proteína putativa ligada ao transporte de ferro na membrana periplasmática (*ceuE*); (vii) a hipuricase (*hipO*) e (viii) a flagelina (*flaA*) foram utilizadas para o desenvolvimento destes métodos (Alm *et al.*, 1993; Eysers *et al.*, 1993; Bastyns *et al.*, 1994; Bustamante *et al.*, 1995; González *et al.*, 1997; Linton *et al.*, 1997; Regimbeau *et al.*, 1998; Van Doorn *et al.*, 1998).

No entanto, em certos casos, a detecção dos produtos de genes específicos pelas técnicas de PCR por si só nem sempre é bastante elucidativa quanto à identificação e diferenciação das estirpes bacterianas a nível de espécies e subespécies. Por isso, a manipulação dos mesmos produtos por restrição, recorrendo a enzimas de corte frequente (4 a 6 bp), ou análise RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphisms”), proporciona uma maior discriminação entre isolados que pode ser visualizada em gel de electroforese convencional (Nachamkin *et al.* 1996, Owen and Loeton, 1999).

Neste caso, os produtos de PCR de muitos genes entre os quais os que acima foram referidos são digeridos com as enzimas de restrição específicas capazes de gerar diferentes padrões de bandas cuja análise permite adicionalmente a tipificação de estirpes de *Campylobacter* spp. aumentando assim o nível de aplicabilidade do método.

Em relação aos genes que codificam para rRNA 16S e 23S, esta técnica é designada por ARDRA (“Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis”).

No entanto, tendo em consideração o nível de conservação muito elevado destes genes em todos os organismos, a região ITS (“Intergenic Transcribed Spacer”), existente no interior dos operões e entre operões adjacentes e sujeito a menor pressão selectiva, é amplificada e o produto obtido digerido com enzimas de restrição de corte frequente.

A aplicação da técnica de PCR-RFLP, utilizando “primers” adequados permite obter perfis polimórficos da região cuja avaliação da diversidade infra-específica por digestão demonstra a potencialidade de aplicação da técnica na tipificação das espécies bacterianas como se pode constatar mais adiante¹.

***gyrA*-PCR (gene-specific PCR)**

A aplicação das técnicas de identificação baseadas em PCR pode ser feita de diversas maneiras, pelo que além da abordagem técnica acima referida (PCR simples), existe uma variante da técnica designada “Multiplex-PCR” ou simplesmente “m-PCR”. Isto é, numa única reacção de PCR, a técnica utiliza em simultâneo vários “primers”, que hibridam com as sequências específicas do DNA-alvo, permitindo que sejam detectadas várias bactérias contaminantes a partir de uma única fonte (Klena, 2001).

A julgar pela sua eficácia, nos últimos anos, muitos investigadores têm utilizado a Multiplex-PCR para a identificação das espécies de diversos géneros bacterianos. Na verdade, a diferença entre esta abordagem técnica e o PCR clássico ou simples pode ainda consistir na combinação e análise simultâneas de mais do que um gene polimórfico.

Com esta técnica, várias espécies bacterianas podem ser identificadas simultaneamente num único processo de PCR, utilizando “primers” específicos que podem hibridar com os respectivos genes a que são dirigidos. Foi assim que Wang *et al.* (2002), seleccionando os genes de 23S rRNA, *hipO* (hipuricase), *glyA* (serina hidroximetiltransferase) e *sapB2* (proteína da camada da membrana externa) que são específicos para cinco espécies de *Campylobacter*, desenvolveram um “Multiplex-PCR”. Com estes genes, a técnica permitiu a identificação simultânea do género e das espécies *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* e *C. fetus* subsp. *fetus*.

¹ A técnica de ITS-PCR-RFLP é uma das técnicas utilizadas para tipificar as estirpes de *Campylobacter* spp. em estudo nesta trabalho da tese, pelo que a matéria relacionada com esta técnica será tratada de forma mais exaustiva mais adiante.

Na verdade, estes genes constituem marcadores moleculares que podem ser utilizados na identificação das espécies de *Campylobacter*, entre as quais *C. jejuni* e *C. coli* que são dois dos mais importantes agentes da campilobacteriose.

De acordo com os dados existentes, a técnica tem-se revelado rápida e fácil na sua execução, sendo ainda de uma elevada sensibilidade. Do ponto de vista clínico, ela tem um potencial como “kit” de diagnóstico para detectar as espécies termófilas de *Campylobacter* em algumas amostras complexas, tais como os alimentos onde estas bactérias são frequentemente isoladas mas geralmente em número muito reduzido (Wang *et al.* 2002).

A análise por “Multiplex PCR”, além de constituir uma boa alternativa aos métodos tradicionais de biotipagem, pode em certas circunstâncias ser utilizada como ferramenta de identificação dos organismos e permitir a confirmação dos resultados obtidos com estes métodos.

No entanto, uma versão desta técnica designada por PCR-RFLP Multiplex pode ser utilizada para analisar os polimorfismos de genes específicos que permitem a diferenciação dos isolados a nível infra-específico. Neste caso, os produtos de amplificação obtidos são digeridos utilizando enzimas de restrição de corte frequente.

Sabe-se que na identificação por biotipagem das espécies de *Campylobacter*, o teste de hidrólise de hipurato de sódio se tem revelado insuficiente e inseguro para discriminar os isolados de *C. jejuni* e *C. coli*, uma vez que isolados de *C. jejuni*, normalmente tidos como capazes de hidrolizar o hipurato de sódio podem, em alguns casos, apresentar resultados negativos para este teste (Totten *et al.*, 1987). Também foram já descritos casos de isolados não pertencentes a *C. jejuni* com teste de hipurato positivo (Denis *et al.* 1999).

Por isso, com objectivo de evitar qualquer dúvida sobre os resultados obtidos com a técnica da biotipagem na segunda parte desta dissertação, recorreu-se a uma identificação molecular através de *gyrA*-PCR que permite a discriminação de estirpes de *C. jejuni* e *C. coli*, confirmando ou não a identidade atribuída a esses isolados por biotipagem.

Neste trabalho, 187 isolados de *Campylobacter* foram submetidos a análise de “PCR-Multiplex” na qual foram utilizados dois pares de “primers” específicos para o gene *gyrA*, sendo o resultado esperado um fragmento específico correspondente a amplificação da sequência génica, cuja dimensão difere de uma espécie para outra permitindo assim a identificação e distinção entre estirpes de *C. jejuni* e *C. coli*.

Para este ensaio foram utilizados dois pares de primers, sendo o primeiro (CAMPY1 e CAMPY2) específico para o gene *gyrA* nos isolados de *C. jejuni* e produzindo um fragmento de cerca de 650 bp (Zirnstien *et al.* 1999; Zirnstien *et al.* 2000), enquanto que o outro par (CAMPY3 e CAMPY4) produz um fragmento de amplificação equivalente a 480 bp e específico para *C. coli* (Zirnstien *et al.* 2000).

A aplicação destes dois conjuntos de “primers” em ensaio de “Multiplex PCR” permite obter produtos de amplificação específicos que identificam as espécies em estudo. Este é o caso que se ajusta ao trabalho aqui descrito, sendo que os resultados obtidos foram confrontados com os dados da identificação fenotípica baseada em testes bioquímicos (hidrólise de hipurato de sódio, produção rápida de H₂S e hidrólise de DNA) com a finalidade de confirmar a identificação fenotípica previamente obtida para os isolados.

Na TABELA 3.1 apresentam-se os “primers” utilizados e as dimensões dos respectivos produtos de amplificação (bp) esperados para cada uma das duas espécies pelo método molecular “*gyrA* m-PCR”.

“Primers”	Sequências	<i>C. coli</i>	<i>C. jejuni</i>
CAMPY1 +	5'-ATTTTAGCAAAGATTCTGAT-3'	-	≈ 650 bp
CAMPY2	5'-CCATAAATTATTCCACCTGT-3'		
CAMPY3 +	5'-TATGAGCGTTATTATCGGTC-3'	≈ 480 bp	
CAMPY4	5'-GTCCATCTACAAGCTCGTTA-3'		

TABELA 3.1:
Primers e suas respectivas sequências e dimensões esperadas do produto de amplificação

1.2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

1.2.1. Extracção de DNA genómico

De acordo com os objectivos e as especificidades das técnicas usadas na análise molecular das estirpes em estudo, dois protocolos distintos foram utilizados para a extracção do DNA total. Assim, para a técnica de *gyrA*-PCR, utilizou-se o método de extracção directa por fervura (“Boiling method”), adaptado Sambrook *et al.* (1989).

Para as restantes técnicas moleculares, nomeadamente, ITS-ARDRA, RFLP-*flaA*, RAPD-PCR, REP-PCR e M13-PCR, este passo (extracção de DNA) foi efectuado com o método de Tiocianato de guanidina - adaptado de Pitcher *et al.* (1989), conforme descrito mais adiante nesta dissertação.

- Extracção directa por fervura (Bactérias Gram -)

“Boiling Method” – Adaptado Sambrook *et al.* (1989)

Utilizando um palito ou ponta estéril de uma ansa de níquel, 1 a 3 colónias foram recolhidas de uma cultura de 24 ou 48 horas em Muller-Hinton com suplemento de 5% de sangue de cavalo desfibrinado.

A seguir, as colónias foram ressuspensas em 50 µl de TE 0,1% Tween 20. Após agitação com um vortex, as suspensões foram incubadas a uma temperatura de 100°C por um período de cerca de 10 minutos até a observação da lise celular (a clarificação da suspensão era indicativa de lise). A suspensão final foi conservada a -20°C até posterior utilização.

1.2.2. Reacção de amplificação

A amplificação por PCR foi efectuada utilizando uma mistura de reacção cujos reagentes e respectivos volumes estão descritos na TABELA 3.2. A mistura final de reacção foi preparada num volume de 25 µl em tubo eppendorf. As condições de amplificação estão descritas na TABELA 3.3.

	Stock	Reacção	µl
DNA	-	-	1.0
Água u.p.	-	-	18.3
PCR buffer	10X	1X	2.5
MgCl ₂	50 mM	1.5 mM	1.5
dNTPs	10 mM	200 µM	0.5
Primer CAMPY1	50 mM	12.5 pmoles	0.25
Primer CAMPY2	50 mM	12.5 pmoles	0.25
Primer CAMPY3	50 mM	12.5 pmoles	0.25
Primer CAMPY4	50 mM	12.5 pmoles	0.25
Taq polimerase	5 U/ µl	1 U	0.2
			25 µl

TABELA 3.2:
Mistura de reacção utilizada
na amplificação da região génica *gyrA*

Acção	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação	94°C	4 min	1
Desnaturação	94°C	1 min	
Annealing	58°C	1 min	32
Extensão	72°C	1 min	
Extensão	72°C	6 min	1

TABELA 3.3:
Programa de amplificação utilizado
na reacção de *gyrA*-PCR

1.2.3. Observação dos fragmentos por electroforese em gel de agarose

Os fragmentos resultantes da reacção de PCR foram separados em géis de agarose a 1% (TBE 0,5X) nos quais foram aplicados 10 µl da reacção. A electroforese decorreu durante 1 hora e 30 minutos, a 90 V e em TBE 0,5X. Depois, o gel foi corado com Brometo de Etídio e a imagem recolhida e digitalizada com o programa KODAK 1D 2.0.

1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise dos resultados foi efectuada por observação visual directa dos géis, tendo-se verificado na amplificação dos DNAs que as estirpes de *C. coli* produziram uma única banda correspondente a 480 bp. Para *C. jejuni*, observaram-se duas situações. Enquanto na maioria dos isolados, se obteve um único produto de amplificação com cerca de 650 bp, em alguns foram observados os dois fragmentos acima referidos. Neste caso, o fragmento de 480 bp apresenta-se sempre com uma fraca intensidade da banda que é observada no gel de agarose.

Na FIGURA 3.1 exemplificam-se alguns perfis de amplificação obtidos por *gyrA*-PCR para a identificação dos isolados a nível de espécie.

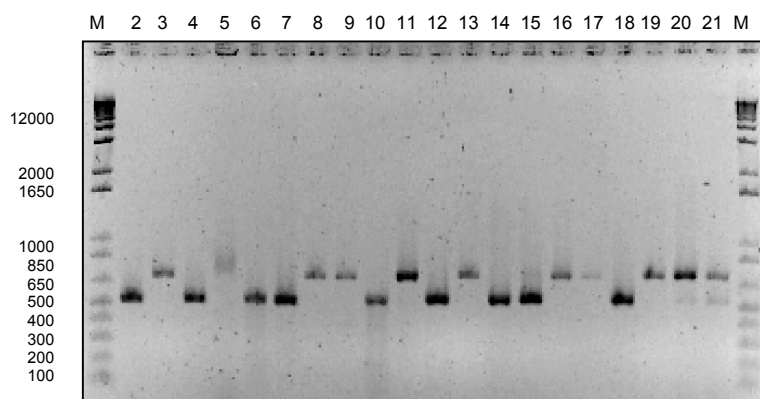


FIGURA3.1:
Exemplificação de perfis
electroforéticos obtidos com
gyrA-PCR .

M: marcador molecular (1 kb plus DNA ladder); 1: S40; 2: S97; 4: S62; 4: S110;
5: S93; 6: S57; 7: S30; 8: S61; 9: S46; 10: S45; 11: 16A; 12: S64; 13: 33A;
14: S70; 15: S53; 16: 17: S55; 18: 53A; 19: S14; 20: S47

Como se pode observar nesta figura, as amostras 2, 4, 6, 7, 10, 12, 14, 15, e 18 correspondem as estirpes identificadas como pertencentes a espécie de *C. coli*, enquanto que os restantes amostras representam os perfis correspondentes a estirpes de *C. jejuni*. Nas "lanes" 19 e 20, podem ser observadas as duas bandas encontradas em algumas estirpes de *C. jejuni*.

De acordo com os resultados obtidos na identificação fenotípica das estirpes (Parte II), sabe-se que dos 187 isolados de *Campylobacter* em estudo, 111 foram identificados como *C. jejuni* e 76 como *C. coli*. A comparação dos resultados obtidos na identificação molecular por *gyrA*-PCR com os provenientes da identificação fenotípica apresenta-se na TABELA 3.4 e permite verificar que apenas 10 dos 187 isolados não tiveram a sua identificação fenotípica confirmada pelo método molecular.

Deste modo, houve realmente uma boa correlação entre a identificação fenotípica por biotipagem e a identificação molecular por *gyrA*-PCR, tendo sido obtida uma concordância de 95% (177/187) entre os dois sistemas de identificação.

Identificação molecular	Identificação fenotípica		
	Espécies	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>
	<i>C. jejuni</i>	101	0
	<i>C. coli</i>	10	76
Σ		111	76
			187

TABELA 3.4: Comparação dos resultados de identificação obtidos com biotipagem e *gyrA*-PCR.

No entanto, tendo em consideração a eficácia e a confiança que as técnicas baseadas na caracterização genómica das estirpes oferecem quando comparadas com os métodos fenotípicos como a biotipagem, que pelas suas limitações¹ torna-se um método menos seguro e de pouca confiança (Nicholson & Patton, 1993; Denis *et al.* 1999) na identificação das estirpes de *Campylobacter* spp., considerou-se como válida a identificação obtida com base nos perfis de *gyrA*-PCR. Deste modo, 10 dos 187 isolados em estudo, responsáveis pela discordância registada entre ambos os métodos, foram reclassificados como *C. coli*.

A nível de espécie, verificam-se duas situações distintas. A primeira diz respeito aos isolados de *C. coli* cuja a confirmação de identificação fenotípica pelo método molecular teve uma concordância de 100%. O que significa que a identificação molecular confirma a identidade fenotípica atribuída a todos os isolados desta espécie.

Mas, em relação a *C. jejuni*, a confirmação da identificação dos isolados obtida pelo método fenotípico não foi total, pois verificou-se uma discordância de cerca de 9% (10/111) entre os dois métodos.

¹ Utilizando o método de biotipagem de Lior (1984) na identificação de *Campylobacter*, o teste de hidrólise de hipurato de sódio é a única das três provas bioquímicas habitualmente utilizadas capaz de separar entre as estirpes de *C. jejuni* e *C. coli*.

Assim, é bom lembrar que, embora o resultado positivo do teste de hipurato esteja descrito só para *C. jejuni*, na verdade estes isolados fenotipicamente identificados como *C. jejuni* deram um produto de amplificação do gene *gyrA* correspondente ao esperado para as estirpes de *C. coli*, sendo por isso reclassificadas como *C. coli*.

Uma situação equivalente foi previamente descrita por Denis *et al.* (1999) que, na aplicação de um método de multiplex-PCR baseado em 3 genes (16S rDNA, *mapA* e *ceuE*), confirmaram a existência de 154 estirpes de *C. coli* hipurato positivas, num conjunto de 220 estirpes previamente identificadas a nível fenotípico como *C. jejuni*.

Com a reclassificação destes isolados, o número de estirpes de *C. coli* passou de 76 para 86 enquanto que em *C. jejuni* foi reduzido de 111 para 101. Sendo assim, as análises dos resultados relacionados com os restantes estudos ao longo dos próximos capítulos desta dissertação terão sempre em consideração este facto.

Na verdade, estes resultados demonstram a importância que tem a utilização simultânea de métodos fenotípicos e moleculares na identificação dos organismos bacterianos, neste caso particular para os isolados de *Campylobacter*.

Tendo em consideração alguns factores de avaliação foram verificadas outras vantagens tais como: (i) a reprodutibilidade intra-laboratorial da técnica que foi testada e avaliada em 95%, utilizando-se cerca de 10% das estirpes em análise como réplicas; e (ii) o reduzido tempo de execução (< 3 horas), que pode ser dividido entre o período que envolve os processos de extracção de DNA e PCR (<1h 30min) e de electroforese (1h 30min). Deste modo, o método de *gyrA* PCR desenvolvido no âmbito deste trabalho revelou ser uma técnica de execução simples e rápida, tal como outros métodos de identificação directa por PCR (Denis *et al.* 1999; Linton *et al.* 1997), que pode ser utilizado como alternativa às técnicas fenotípicas ou convencionais, como a biotipagem, na identificação das estirpes de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* envolvidas em casos de surtos.

2.1. ANÁLISE POR ITS-ARDRA

2.1.1. INTRODUÇÃO

Os genes que codificam para rRNA 16S, 23S e 5S estão organizados em operões *rrn* que se encontram localizados em múltiplas cópias ao longo do genoma bacteriano. As regiões ocupadas por estes genes são caracterizadas pela sua variabilidade nas sequências nucleotídicas e comprimento de cada uma delas, daí os polimorfismos de sequências e/ou de dimensão que podem ser utilizados na identificação e tipificação das estirpes bacterianas.

Os operões *rrn* bacterianos apresentam uma sequência intergénica designada por ITS (Intergenic Transcribed Spacer) situada entre o rDNA 16S e o rDNA 23S, como ilustra a Figura 3.2, e que codifica normalmente para alguns tRNAs, sendo na sua maioria considerada uma região não codificante.

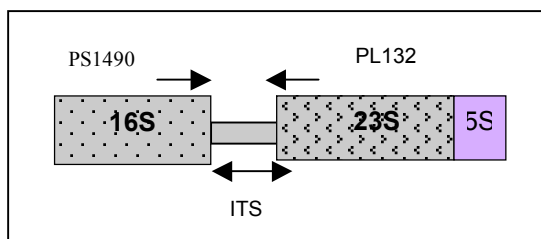


FIGURA 3.2:

Organização do operão *rrn* e localização dos sítios de "annealing" para os "primers" utilizados.

Em consequência disso, a pressão selectiva a que está sujeita a região ITS é sempre inferior à dos rDNAs, permitindo uma taxa de mutação superior, e por consequência a ocorrência de variabilidade que está associada a maior número de polimorfismos desta região.

Por esta razão, esta característica das regiões ITS tem sido aproveitada para o desenvolvimento de métodos moleculares que são utilizados na análise das populações bacterianas, quer ao nível específico, quer infra-específico.

Em *Campylobacter* spp., particularmente nas estirpes termófilas, nomeadamente *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari*, muitos estudos indicam existir 3 cópias de operões *rrn* (Kim & Chan, 1989; Taylor *et al.*, 1992). Mas, sabe-se que muitas vezes estirpes pertencentes ao mesmo género ou até à mesma espécie podem apresentar arranjos diferentes dos seus operões *rrn* no genoma (Kim & Chan, 1991).

Por isso, as 3 cópias dos genes de rRNA 16S e 23S referidos no cromossoma de *C. jejuni* e *C. coli* podem ter arranjos diferentes daquele que geralmente é apresentado. Taylor *et al.* (1992), ao confirmarem a presença de 3 cópias de cada um destes genes em estirpes de *C. jejuni* e *C. coli*, simultaneamente, demonstraram também que nestas bactérias, apenas duas cópias de rDNA 16S e 23S foram encontradas adjacentes enquanto que a terceira cópia destes genes se encontrava separada e distante no genoma.

Importa referir que o número de cópias das regiões ITS é proporcional ao número de par de cópias dos genes rRNA 16S e 23S constituídas em operões *rrn* intactos. Portanto, a presença de dois ou três operões com igual dimensão não pode ser excluída (Christensen *et al.*, 1999).

Como em muitas bactérias, a região ITS dos operões *rrn* das estirpes termófilas de *Campylobacter* spp. é utilizada como alvo na identificação e tipificação baseadas em PCR. Assim, um dos métodos que se tem revelado promissor para estudos taxonómicos e de epidemiologia molecular das estirpes bacterianas consiste na amplificação por PCR das regiões intergénicas do operão *rrn*, tecnicamente denominada “ITS-PCR”, tendo como objectivo produzir perfis de bandas que reflectem, ainda que parcialmente, a estrutura genómica das estirpes em estudo.

As sequências nucleotídicas desta região revelaram-se essencialmente importantes devido ao seu elevado grau de conservação que as torna numa das ferramentas importantes para estudos de Taxonomia. No entanto, embora com grau de conservação inferior ao das sequências dos tRNAs, as mutações que nelas possam ocorrer são consideradas responsáveis pela diversidade das populações bacterianas. Os polimorfismos de sequências geralmente obtidos entre as regiões intergénicas podem ter como causas a alteração de dimensões dos fragmentos e/ou dos locais de reconhecimento de enzimas de restrição devido à ocorrência de “indels” (inserções e deleções) e/ou mutações pontuais nas sequências, respectivamente.

De acordo com os estudos existentes, para a técnica de PCR, nas suas variantes ITS-PCR ou tRNA-PCR, atendendo se a amplificação é da região ITS ou dos tRNAs, respectivamente, foram desenhados “primers” universais para as sequências de genes ribossomais que flanqueiam estas regiões ITS.

Por um lado os produtos de amplificação obtidos podem ser objecto de sequenciação que, após alinhamento directo de sequências e aplicação de algoritmos de reconstrução filogenética, permite estabelecer relações filogenéticas entre indivíduos ou estirpes a nível de espécies e infra-específico.

Mas as capacidades desta técnica não se esgotam aí, podendo ser utilizada na sua versão ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) para a determinação dos polimorfismos de restrição.

Os genes ribossomais, rRNA 16S e rRNA 23S, além de altamente conservados ao longo do cromossoma bacteriano, constituem também o espaço onde se situam locais de restrição enzimática, pelo que as análises por ITS-ARDRA beneficiam do carácter conservador destas regiões. Por outro lado, como a região ITS se caracteriza pela hipervariabilidade de sequências, a sua amplificação e posterior análise de restrição aumenta a capacidade discriminatória da técnica, conferindo-lhe potencial de “fingerprinting”.

Como um dos objectivos deste trabalho, procurou-se através da técnica ITS-RFLP avaliar o nível de discriminação das 187 estirpes de *Campylobacter* spp. que foram isoladas em amostras de frangos de Angola e Portugal. O grau de diferenciação desta técnica foi posteriormente comparado com o obtido com a digestão dupla do gene *flaA* (ponto 2.3 desta Parte).

2.1.2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

1. Extracção de DNA

Método do Tiocianato de Guanidina – Adaptado de Pitcher *et al.* (1989)

O protocolo a seguir é utilizado para o isolamento de DNA, quer nas bactérias Gram +, quer nas Gram –, e foi escolhido neste estudo para extrair o DNA total das estirpes de *Campylobacter* spp. utilizado nas restantes técnicas de análise molecular, a saber: técnicas de análise por ITS-ARDRA e RFLP-*flaA*, assim como de “PCR-fingerprinting” (RAPD-PCR, Rep-PCR e PCR-M13).

Com este método, foi extraído o DNA genómico das 187 estirpes de *Campylobacter* spp. em estudo. Para isso, foram utilizadas culturas de 18 a 24 horas (em Müller Hinton suplementado com 5% de sangue de cavalo desfibrinado), crescidas em condições de microaerofília. A seguir, construiu-se um banco de extractos de DNA.

Para cada isolado uma quantidade suficiente de cultura foi recolhida em TE (Tris-EDTA, pH 8.0) e submetida a uma centrifugação de 10 minutos (8000 rpm) para a lavagem das células. Os “pellet” obtidos foram ressuspensos em TE (250µl) numa concentração de 10 mg/ml (peso fresco), e transferidos para outros tubos que depois foram incubados a 37°C durante 2 horas após adição de 500µl de reagente de GES (5M tiocianato de guanidina, 100 mM EDTA e 0,5% sarcosil). A suspensão foi agitada suavemente por inversão dos tubos (para confirmação da lise celular), que em seguida foram colocados em gelo durante um período de 10 minutos (a transparência da solução era indicativo da lise celular). Após adição de 500 µl de acetato de amónio 10M frio, os tubos foram colocados novamente em gelo.

Para a extracção dos ácidos nucleicos adicionaram-se 500 µl de uma solução de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) enquanto que a precipitação dos mesmos foi obtida com a adição de igual volume de isopropanol frio. Com uma ansa de plástico esterilizada recolheu-se o precipitado por enrolamento, quando verificada a formação de novelo, ou procedeu-se a centrifugação no caso contrário. E, após lavagem por agitação da ansa em álcool a 70%, os ácidos nucleicos foram secos e em seguida solubilizados num volume de 500 µl de TE (pH 8.0).

A seguir, após adição de 500 µl de RNase numa concentração de 50 µg/ml e incubação em banho a 37°C durante 2 horas (ou ainda à temperatura ambiente “overnight”), procedeu-se a uma nova extracção com igual volume da solução de clorofórmio:álcool isoamílico e à fase aquosa recolhida por centrifugação foi adicionada uma solução de acetato de sódio a 3M para uma concentração final de 0,3M.

Em seguida, precipitou-se e lavou-se o DNA extraído com 2,5 volumes de etanol absoluto frio (-20°C) e etanol a 70%, respectivamente. No final, os extractos de DNA obtidos foram dissolvidos em 100µl de TE (pH 8.0) e conservados a 4°C até utilização.

Quantificação de DNA

A determinação da concentração de DNA extraído para cada estirpe foi efectuada, utilizando a leitura da absorvância a 260 nm por espectrofotometria (Sambrock *et al.* 1989). Como se sabe, as bases pirimídicas e purícas dos ácidos nucleicos absorvem a este comprimento de onda enquanto que, por sua vez as proteínas absorvem maioritariamente a 280 nm (Hancock, 1999). Por esta razão, procedeu-se sempre a leitura a 280 nm, efectuando-se a estimativa da pureza do DNA mediante o cálculo da razão entre os resultados obtidos na leitura dos respectivos comprimentos de onda (A_{260}/A_{280}). A conversão dos valores de absorvância em concentrações (ng/µl) foi feita utilizando a seguinte equação:

$$[DNA] = \frac{A_{260} \times 50 \times V_t}{V_{DNA}}$$

Em que V_t é o volume total utilizado e o factor 50 corresponde à concentração de DNA equivalente a 1U de absorvância a 260nm (50 ng/µl). Na determinação da razão A_{260}/A_{280} , valores entre 1,8 e 2,0 são considerados indicativos de um grau de pureza aceitável no DNA extraído. De facto, sabe-se que ao determinar a concentração dos ácidos nucleicos, deve-se ter em consideração que o DNA de cadeia dupla (dsDNA) apresenta um valor desta razão de cerca de 1,8, enquanto que o RNA, que muitas vezes pode escapar à eliminação durante o processo de extracção, apresenta valores da razão A_{260}/A_{280} próximos de 2,0. Quanto às proteínas, a razão A_{260}/A_{280} deve situar-se abaixo de 1, mais concretamente a cerca de 0,5 (Turner *et al.*, 2000).

2. Reacções de amplificação

Os extractos de DNA das amostras foram diluídos e depois amplificados por PCR, utilizando os “primers” universais PS1490 para 16S rDNA e PL132 para 23S rDNA, cujas sequências são 5’TGCGGCTGGATCCCCTT-3’ e 5’-GGGTTTCCCCATTTCGG-3’, respectivamente (a localização relativa dos dois “primers” está esquematizada na FIGURA 3.2). Nesta reacção de amplificação, o produto obtido corresponde à sequência ITS que separa os dois genes ribossomais (rDNA16S e rDNA23S).

A amplificação foi efectuada num volume de mistura total de 50 µl, composto por 2,5 µl de cloreto de magnésio 50 mM, 5 µl de tampão de PCR 10X, 1 µl de cada “primer” 50 mM, 1 µl de dNTPs e 0,5 µl de Taq DNA polimerase 5 U/µl (Invitrogen), 35 µl de água ultrapura e 5 µl de amostra de DNA. As condições de amplificação usadas no termociclador Robocycler (Stratagene) estão descritas na TABELA 3.5.

Acção	Temperaturas	Período	N.º de ciclos
Desnaturação	95°C	3’	1
Desnaturação	95°C	1’	
“Annealing”	55°C	1’	30
Extensão	72°C	1’	
Extensão final	72°C	5’	1

TABELA 3.5:
Programa de amplificação utilizado na análise das regiões ITS

O produto de amplificação de cada amostra de DNA obtido nas reacções de PCR foi visualizado em gel de agarose a 1%. O processo de electroforese durou cerca de duas horas, e foi aplicada (em cada poço do gel) uma quantidade de 5 µl do produto de reacção.

3. Restrição por endonucleases dos fragmentos amplificados

Os fragmentos amplificados (amplicões), correspondentes às regiões ITS foram em seguida submetidos a uma digestão simples pela técnica de ITS-ARDRA, utilizando as enzimas de restrição, *Sau* 3AI e *Hae* III, respectivamente

Para cada estirpe em estudo, procedeu-se a digestão de 10 µl do produto de amplificação num volume total de 20 µl, contendo 5 U da enzima de restrição e 1X tampão da enzima.

Na TABELA 3.6 apresentam-se as condições de uso e locais de corte das endonucleases utilizadas na análise dos isolados por ITS-ARDRA, atendendo às recomendações do fabricante.

Enzimas de restrição	Tampão de enzima	Fabricantes	Sequências de corte	TABELA 3.6: Endonucleases utilizadas na digestão dos amplicões das regiões ITS.
<i>Sau</i> 3AI	nbl2	Kramel	↓GATC	
<i>Hae</i> III	nbl2	Kramel	GG↓CC	

A digestão foi efectuada “overnight” a 37°C, em o banho. Devido à frequente perda de fragmentos amplificados durante a fase de purificação dos mesmos, optou-se pela utilização directa dos produtos de PCR na reacção de digestão.

4. Observação dos perfis obtidos por electroforese

Os fragmentos resultantes da reacção foram separados em géis de agarose a 1,2% nos quais foram aplicados 10 µl da reacção de digestão. A electroforese decorreu durante 2 horas e 30 minutos, a 90 V, e em TBE 0,5X. Depois, o gel foi corado com brometo de etídio e a imagem recolhida e digitalizada com o programa informático KODAK 1D 2.0.

2.1.3. RESULTADOS

Ao propôr-se a amplificação das regiões ITS em amostras de DNA de *Campylobacter* com os “primers” PS1490 e PL132 que hibridam com as sequências dos genes rRNA16S e rRNA23S, respectivamente, parte-se do pressuposto que as dimensões dos amplicões esperados variam entre 830 e 950 bp para *C. jejuni*, e entre 980 e 1100 bp para *C. coli*, tendo em consideração a seguinte fórmula¹: [20 + ITS + 149] bp.

A análise dos resultados obtidos obedeceu a uma estratégia definida a fim de permitir o agrupamento dos isolados de acordo com os diferentes perfis de restrição obtidos com as endonucleases *Sau* 3AI e *Hae* III. Sendo assim, após o processo de digitalização das imagens de géis, procedeu-se à análise dos perfis de restrição obtidos, identificando os fragmentos (bandas). Utilizando o software BioNumerics (Applied Maths), determinaram-se as massas moleculares estimadas dos fragmentos de cada estirpe em experiência e os valores correspondentes foram exportados para uma folha de cálculo do programa EXCEL, identificando-se e agrupando-se as estirpes que apresentavam igual número de fragmentos iguais (bandas com as mesmas massas moleculares).

¹ Nesta fórmula consideram-se 20 bp correspondentes à amplificação da porção 3' terminal do rDNA 16S e 149 bp correspondentes à amplificação da porção 5' inicial do rDNA 23S. Os limites apresentados para os amplicões esperados em *C. jejuni* e *C. coli* foram calculados a partir dos valores mínimo e máximo da dimensão da região ITS disponíveis na bibliografia, tal como descrito na TABELA 3.7.

Desta análise comparativa, ainda fizeram parte os perfis teóricos esperados de algumas estirpes previamente selecionadas de ambas as espécies de *Campylobacter*. Estes perfis teóricos foram obtidos recorrendo-se ao programa informático NEBCUTTER (New England Biolabs), disponível na Internet através do “website” <http://www.neb.com>.

Na FIGURA 3.3 exemplificam-se alguns perfis de ITS-ARDRA encontrados entre as 168 estirpes de *C. jejuni* e *C. coli* analisadas neste ensaio.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 M 16 17 18 19

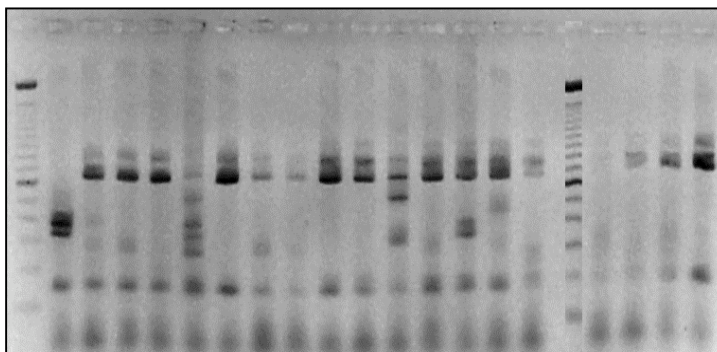
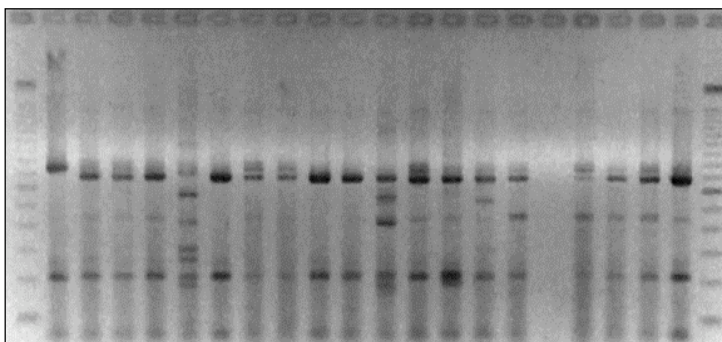


FIGURA 3.3:
Perfis de restrição experimentais obtidos a partir dos amplificadores dos ITS de *C. jejuni* e *C. coli*

A – *Sau3AI*

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 M



B – *HaeIII*

M: marcador molecular (100 bp DNA ladder); 1: S46; 2: S47; 3: S48; 4: S49; 5: S50; 6: S51; 7: S53; 8: S56; 9: S57; 10: S58; 11: S59; 12: S60; 13: S62; 14: S64; 15: S65; 16: S67; 17: S68; 18: S65 duplicado; 19: S69.

As massas moleculares dos fragmentos de restrição experimentais obtidos neste ensaio foram estimadas pelo cálculo das médias e dos desvios padrão dos respectivos fragmentos, tendo sido obtidos 4 perfis-tipos que posteriormente foram confrontados com os perfis-tipos já definidos por alguns autores como Christensen *et al.* (1999), Parkhill *et al.* (2000) e Kim *et al.* (1995) e que estão apresentados na TABELA 3.7.

Mas, para uma melhor compreensão dos termos usados na análise dos dados obtidos foi adoptado um simbolismo apropriado. Assim para os resultados “*in silico*”, os perfis de restrição detectados foram inicialmente designados por S1 a S6 ou H1 a H6, dependentemente de a enzima utilizada na digestão ser *Sau3AI* ou *HaeIII*, respectivamente (TABELA 3.7).

Como existe uma correspondência total entre os perfis de restrição obtidos com *Sau*3AI e *Hae*III, isto é, a cada perfil de restrição *Sau*3AI diferente corresponde também um perfil diferente na restrição com *Hae*III, os perfis foram denominados por SH1P², SH2P, SH3P, SH4P, SH5P e SH6P enquanto que os 4 perfis resultantes dos dados experimentais foram denominados por SH1A¹, SH2A, SH3A e SH4A (TABELA 3.8).

Como se pode observar, com as 15 estirpes de referência analisadas, foram obtidos 6 padrões de restrição distintos (TABELA 3.7), 3 para *C. jejuni* e 3 para *C. coli*.

Para a enzima *Sau*3AI e “*in silico*”, todas as estirpes, quer de *C. jejuni* quer de *C. coli*, apresentaram uma banda de 171 bp. Em relação a *C. jejuni*, a diferenciação entre os perfis foi suportada pela previsão de uma segunda banda ou fragmento, nos perfis S1 (SH1P) e S2 (SH2P), enquanto que na única estirpe do perfil S3 (SH3P) prevê-se um terceiro fragmento de cerca de 279 bp. Para as 4 estirpes de *C. coli* incluídas nos 3 restantes perfis “*in silico*” foram previstas 3 bandas, com excepção do perfil S5 (SH5P), com mais uma quarta banda de 197 bp.

TABELA 3.7:

Resultados da análise “*in silico*” de sequências ITS de estirpes de referência de *C. jejuni* e *C. coli*.

N.º acesso GenBank	Espécie	Estirpe	MW corrigidas (para incluir "primers")												Dimensões Amplificações ITS
			Σ	Sau 3AI						HaeIII					
AF074831	C. jejuni	JEO2677 a)	952	S1	171	738				H1	208	66	678		750 bp
AF074828		NCTC11168 a)	955	S1	171	741				H1	208	66	681		753 bp
AF074833		JEO2693 a)	953	S1	171	739				H1	208	66	679		751 bp
AF074835		JEO2762 a)	952	S1	171	738				H1	208	66	678		750 bp
AF074829		NCTC11392 a)	866	S2	171	652				H2	208	66	592		664 bp
AF074830		KJ7 a)	953	S1	171	739				H1	208	66	679		751 bp
AF074834		JEO2759 a)	954	S1	171	740				H1	208	66	680		752 bp
AF074832		JEO2677 a)	953	S1	171	739				H1	208	66	679		751 bp
AF074836		NCTC11951T a)	980	S3	171	487	279			H3	208	66	706		778 bp
AL139074		11168 b)	955	S1	171	741				H1	208	67	680		753 bp
Z29326		TGH9011 c)	954	S1	171	740				H1	208	67	679		752 bp
AF074837	C. coli	NCTC11366T a)	1025	S4	171	379	432			H4	208	66	751		823 bp
AF074838		NCTC11353 a)	1014	S4	171	378	422			H4	207	66	741		812 bp
AF074839		JEO2772 a)	1148	S5	171	679	58	197		H5	208	66	647	227	946 bp
AF074840		JEO2777 a)	1116	S6	171	466	436			H6	208	66	842		914 bp

a: Christensen *et al.* (1999); b: Parkhill *et al.* (2000); c: Kim *et al.* (1995).

² A abreviatura SH1P, SH2P, etc. significa perfil 1, 2, etc. produzido com a endonuclease *Sau*3AI e *Hae*III resultantes dos dados “*in silico*”, enquanto que SH1A, SH2A, etc. correspondem aos perfis 1, 2, etc. produzido com as endonucleases *Sau* 3AI e *Hae* III, utilizando os dados experimentais de ITS-ARDRA.

Para a enzima *HaeIII*, a TABELA 3.7 mostra que em todos os perfis se previram com 3 bandas ou fragmentos de restrição, exceptuando o perfil H5 (SH5P) com 4 fragmentos distintos. Com esta enzima, previu-se a existência de duas bandas comuns para todas as sequências de DNA analisadas, pelo que a diferenciação entre as estirpes incluídas em perfis diferentes resulta da terceira banda de cada agrupamento obtido.

Na generalidade, pode-se afirmar que os 6 perfis “*in silico*” constituem um número bastante elevado, particularmente considerando apenas os 13 isolados de ambas espécies envolvidos no ensaio de Christensen *et al.* (1999). De facto, os resultados da TABELA 3.7, mostram que é diferenciar estirpes de *C. jejuni* e *C. coli*, tanto a partir da análise directa dos fragmentos de amplificação da região ITS (através da dimensão do amplicão), como pelos perfis de bandas produzidos com a digestão *Sau3AI* ou *HaeIII* destes amplicões.

Os resultados experimentais obtidos neste trabalho para a amplificação da região ITS e para ITS-ARDRA estão apresentados nas TABELAS 3.8 e 3.9, respectivamente. No entanto, a não amplificação/restricção ou ocorrência de amplificação/restricção não específica em alguns casos levou a que apenas se obtivessem dados interpretáveis para 168 dos 187 isolados inicialmente incluídos neste estudo. De forma a facilitar a análise dos mesmos, e de acordo com a estratégia já descrita, apresenta-se uma comparação entre os dados experimentais obtidos e os perfis teóricos (“*in silico*”) disponíveis.

De uma forma geral (TABELA 3.8), foi detectado um único fragmento como produto de amplificação dos ITS em 153 (91,1%) dos 168 isolados de *Campylobacter* em análise, enquanto que nos restantes 15 (8,9%) isolados, previamente identificados como sendo da espécie *C. coli*, foram detectados 2 amplicões com os pesos moleculares médios de 837 e 1043 bp.

TABELA 3.8:
Perfis “*in silico*” e padrões experimentais obtidos na amplificação da região ITS

SH1P	SH2P	SH3P	SH4P	SH5P	SH6P								
						SH1A	SH2A		SH3A		SH4A		
						<i>m</i>	<i>s</i>	<i>m</i>	<i>s</i>	<i>m</i>	<i>s</i>	<i>m</i>	<i>s</i>
953	866	980	1020	1148	1116	965	63	1007	46	978	68	1043	34
												873	56

m e *s*: valor médio e desvio-padrão (bp), calculados no conjunto de estirpes com o mesmo perfil

Para cada uma das enzimas (*Sau3AI* e *HaeIII*), a digestão dos produtos de amplificação da região ITS das estirpes em estudo produziu os perfis de restrição que são apresentados nas TABELAS 3.9 e 3.10, respectivamente. Assim sendo, foram detectados 4 perfis de restrição distintos entre os 168 isolados de *Campylobacter* incluídos nesta experiência (SH1A a SH4A).

Para a endonuclease *Sau* 3AI (TABELA 3.9), a digestão do produto de amplificação do único amplicão de 965 bp que forma o perfil SH1A permitiu a detecção de duas bandas de 763 e 176 bp, enquanto os perfis SH2A e SH3A também com um único fragmento de amplificação (1007 e 978 bp, respectivamente) apresentaram 3 e 4 bandas, respectivamente.

Por último, no perfil SH4A, a digestão dos dois fragmentos de amplificação obtidos permitiu detectar 4 bandas ou fragmentos de restrição cujas dimensões moleculares foram de 580, 412, 297 e 185 bp, respectivamente.

SH1P	SH2P	SH3P	SH4P	SH5P	SH6P								
						SH1A	SH2A	SH3A	SH4A				
						m	s	m	s	m	s	m	s
739	652	487	427	679	466	763	34	458	18	329	24	580	11
171	171	279	379	197	436	176	22	402	14	320	17	412	20
		171	171	171	171			177	10	193	29	297	31
				58						169	14	185	8

TABELA 3.9:
Padrões "*in silico*" (SH1P-SH6P) e perfis de restrição experimentais (SH1A-SH4A) obtidos com a endonuclease *Sau*3AI

m e s: valor médio e desvio-padrão (bp), calculados no conjunto de estirpes com o mesmo perfil

Com a endonuclease *Hae*III (TABELA 3.10), foram igualmente obtidos 4 padrões de restrição experimentais que, como já referido, são designados de forma idêntica. Nesta análise constatou-se que todos os perfis desta experiência apresentam 3 fragmentos de restrição que variam entre 678 e 794 bp, para as bandas de maior peso molecular, enquanto que os de menores massas moleculares variam entre 70 e 226 bp. O grupo intermédio de bandas detectadas nestes perfis de restrição variou entre 217 e 597 bp.

SH1P	SH2P	SH3P	SH4P	SH5P	SH6P	SH1A	SH2A	SH3A	SH4A				
						m	s	m	s	m	s	m	s
679	592	706	746	647	842	678	13	695	9	679	20	794	18
208	208	208	208	227	208	217	9	221	8	231	33	597	16
66	66	66	66	208	66	77	14	70	9	79	21	226	8
				66									

TABELA 3.10:
Padrões "*in silico*" (SH1P-SH6P) e perfis de restrição experimentais (SH1A-SH4A) obtidos com a endonuclease *Hae*III

m e s: valor médio e desvio-padrão (bp), calculados no conjunto de estirpes com o mesmo perfil

Com a aplicação de ITS-ARDRA, e atendendo os objectivos deste trabalho, esperava-se identificar e diferenciar as estirpes das 187 estirpes de *C. jejuni* e *C. coli* envolvidas neste estudo. Mas, como já foi referido, apenas foi possível aplicar ITS-ARDRA a 168 dos 187 isolados, pelo que a capacidade de tipificação obtida foi de 89,8%.

A distribuição das estirpes por perfis obedeceu aos critérios de avaliação que envolveram o número e as dimensões dos fragmentos de restrição obtidos para cada estirpe. Assim, como se pode observar na TABELA 3.11, a distribuição das 168 estirpes nos 4 perfis de ITS-ARDRA detectados permitiu constatar o seguinte: com a exceção do perfil SH4A, que é exclusivamente constituído por *C. coli*, todos os outros possuem, embora em proporções desiguais, estirpes pertencentes a ambas espécies de *Campylobacter* em estudo.

Em geral, verificou-se que o agrupamento SH1A, formado por 42,3% das estirpes, é o perfil mais frequentemente encontrado, enquanto que o perfil SH4A, com apenas 8,9% de estirpes, constitui o agrupamento menos frequente. Nos outros dois perfis, SH2A e SH3A, incluíram-se 23,8% e 25% de estirpes, respectivamente.

	SH1A	SH2A	SH3A	SH4A	Σ	ND	Σ
<i>C. jejuni</i>	59	12	23	0	94	7	101
<i>C. coli</i>	12	30	17	15	74	12	86
Σ	71	42	40	15	168	19	187

TABELA 3.11:
Distribuição dos isolados de cada espécie pelos perfis de ITS-ARDRA obtidos com as endonucleases *Sau3AI* e *HaeIII*.

SH1A a SH4A: perfis experimentais; ND: não determinado

Analisando cada um dos agrupamentos de ITS-ARDRA verificou-se que, com a exceção do perfil SH4A, nenhum dos perfis de restrição experimentais obtidos é característico de uma única espécie. Para o perfil SH4A verificou-se ainda que todas as estirpes de *C. coli* nele incluídas eram provenientes de Angola.

Relativamente ao número de agrupamentos detectados para cada espécie, as 94 estirpes de *C. jejuni* distribuíram-se em 3 perfis de restrição experimentais distintos (SH1A, SH2A, SH3A) enquanto que as 74 de *C. coli* estiveram presentes em todos os perfis detectados neste ensaio.

Por esta razão, pode-se afirmar que apesar do agrupamento SH4A ser especificamente homogéneo, pois encontra-se exclusivamente constituído por estirpes de uma única espécie (*C. coli*), a análise por ITS-ARDRA não demonstrou capacidade suficiente para discriminar estirpes de ambas espécies (*C. jejuni* e *C. coli*). Portanto, esta técnica não demonstrou potencial identificativo de isolados de *Campylobacter* a nível de espécie.

Comparando estes resultados experimentais com os perfis de restrição “*in silico*”, verificou-se que o restritipo experimental SH1A difere do perfil de restrição padrão SH1P apenas por alguns pares de bases mas que, no entanto, ambos apresentam o mesmo número de fragmentos obtidos, quer por amplificação dos ITS (uma única banda), quer por restrição deste por *Sau3AI* (2 bandas) e *HaeIII* (3 bandas).

O perfil de restrição padrão SH1P (*in silico*) é exclusivamente constituído por estirpes de *C. jejuni* enquanto que o perfil de restrição experimental SH1A é formado por ambas as espécies de *Campylobacter* analisadas, embora ocorra uma clara predominância das estirpes de *C. jejuni* (83,1%) neste agrupamento.

Quanto aos agrupamentos experimentais SH2A e SH3A, nenhum destes perfis mostrou especificidade para alguma das espécies em análise.

Embora tenha sido objectivo deste trabalho demonstrar a aplicabilidade deste método na discriminação das estirpes e verificar a existência das relações taxonómicas entre as mesmas a nível de espécie, não foi possível, a partir dos dados obtidos, definir marcadores moleculares capazes de agrupar a nível de espécie as estirpes em análise.

2.2. ANÁLISE POR RFLP-*flaA*

2.2.1. INTRODUÇÃO

Estudos existentes têm demonstrado que a motilidade celular e a colonização efectiva do tracto gastrointestinal causada por *Campylobacter* estão intimamente relacionadas com a presença dos flagelos polares que são também o maior antigénio proteico da superfície celular (Logan and Trust, 1983; Newell, 1986; Marooka *et al.*, 1985; Newell *et al.*, 1985; Walker *et al.*, 1986).

Os flagelos são tipicamente constituídos por um filamento externo com cerca de 100 cópias de subunidades proteicas chamadas flagelina. Estes genes podem ser encontrados dispersos em vários operões, sendo a sua expressão uma sequência ordenadamente controlada de acontecimentos (Komeda, 1986; Kutshukake *et al.*, 1990; Macnab, 1988).

Nalgumas bactérias patogénicas, os flagelos possuem um único tipo de flagelina enquanto que em *C. coli* (Guerry *et al.*, 1991), *C. jejuni* (Nuijten, *et al.*, 1990), *H. pylori* (Ely & Shapiro, 1984), *Caulobacter crescentus* (Thomashow & Rittenberg (1985) e *Rhizobium melilotis* (Pleier & Schmitt, 1989), os filamentos flagelares são compostos por dois ou mais tipos de flagelina.

No caso específico de *Campylobacter*, a presença de dois genes de flagelina foi descrita por Guerry *et al.* (1988), que demonstraram ainda que ambos ocupam posições adjacentes e são orientados em “tandem” no cromossoma da estirpe VC167 de *C. coli*. Os resultados deste estudo foram depois confirmados por Nuijten *et al.* (1990) que, analisando as sequências nucleotídicas destes genes (*flaA* e *flaB*) na estirpe 81116 de *C. jejuni*, demonstraram a coabitação de ambos num único filamento.

Mas, consta que a inativação de *flaB* que, geralmente está em quantidade significativamente baixa no cromossoma de *Campylobacter*, provoca um decréscimo na ordem de 100 a 1000 vezes da capacidade de invasão e colonização destas bactérias (Nuijten *et al.*, 1989; Guerry *et al.*, 1991), enquanto que na ausência ou inativação de *flaA*, as mesmas bactérias podem desenvolver um filamento flagelar de morfologia truncada na superfície da célula que, por consequência, teria uma motilidade funcional reduzida (Wassenaar *et al.* 1993).

A flagelina é também uma proteína antigénica imuno-dominante que pode ser reconhecida durante a infecção, sendo por isso importante e determinante na virulência de *Campylobacter* (Guerry *et al.*, 1990). Por esta razão, e segundo Wenman *et al.* (1985a; 1985b), os flagelos foram utilizados como factor determinante na definição dos quatro tipos de serotipos de Lior, LIO5, LIO6, LIO7 e LIO17.

A homologia das sequências muito aproximada entre *flaA* e *flaB* leva a pensar na ocorrência de um processo de duplicação de uma delas ou na recombinação genética dentro da mesma estirpe, supondo-se ainda que os genes *flaA* e *flaB* tenham funções em momentos possivelmente distintos ou de acordo com a variação das condições ambientais.

No entanto, apesar dos genes *flaA* e *flaB* estarem muito relacionados, com um elevado grau de identidade sequencial de nucleótidos, consta que cada um é transcrito e controlado por um promotor diferente, sendo σ^{28} e σ^{54} para *flaA* e *flaB*, respectivamente (Cox *et al.*, 1996).

Sabe-se também que a homologia das sequências entre os genes da flagelina se restringe ao nível das regiões 5' (83,7%) e 3' (86%) terminais (Joys, 1985; Trachtenberg & DeRosier, 1988; Vonderviszt *et al.*, 1989; Fischer & Nachamkin, 1991). Além de ser consideradas altamente conservadas, muitos investigadores atribuem a estas regiões um importante papel na translocação da própria flagelina e na polimerização e estabilidade do filamento flagelar (Kuwajima *et al.*, 1986; Homma, 1987; Fedorov *et al.*, 1988; Kuwajima, 1988; Vonderviszt *et al.*, 1989, Namba *et al.*, 1989; Vonderviszt *et al.*, 1991).

Dos cerca de 1760 bp que compõem a sequência de *flaA*, há entre 1000 e 1300 bp que com maior variabilidade e que correspondem à região central do gene que provavelmente codifica para o que se prevê ser o maior epítipo antigénico. Nas estirpes de *C. upsaliensis*, o tamanho das sequências destes genes parece ser maior que os seus homólogos nas estirpes de *C. jejuni* e *C. coli*.

Ao contrário das regiões terminais, a região central do *flaA* tem largas diferenças em tamanho e conteúdo de aminoácidos que parecem ser responsáveis pela diversidade antigénica encontrada entre os genes *flaA* das Enterobacteriaceae (Joys, 1976; Iino, 1977; Joys, 1988; Kuwajima, 1988).

Deste modo, atendendo às evidências imunológicas encontradas em muitas estirpes de *Campylobacter* spp., Nuijten *et al.* (1990) sugeriram que esta estrutura fosse utilizada como modelo válido para *C. jejuni*. Por esta razão, a utilização de uma pequena porção desta região na diferenciação de *Campylobacter* revelou-se muito significativamente útil na determinação dos serótipos e genótipos para os estudos epidemiológicos (Meinersmann, 1996).

Para Caldwell *et al.* (1985) e Harris *et al.* (1987b), a expressão génica da flagelina corresponde a uma variação antigénica e de fases. A variação de fases corresponde à habilidade de algumas estirpes bacterianas, como as de *Campylobacter* spp., para exibir uma transição entre fenótipos flagelado e não flagelado, enquanto que a variação antigénica consiste na habilidade das mesmas em expressar reversivelmente flagelos de diferentes especificidades antigénicas.

Por outro lado, a clonagem de um gene da estirpe V167 de *C. coli* permitiu esclarecer os mecanismos envolvidos na variação antigénica e determinar a sua sequência nucleotídica. O resultado da experiência concluiu que esta variação está associada a um rearranjo num local adjacente ao gene estrutural no genoma (Guerry *et al.*, 1988; Logan *et al.*, 1989a).

Mas, Endtz *et al.* (1993), numa experiência baseada em PCR constataram que, em estirpes que exibem uma reacção serológica variável, não foram alterados os perfis genéticos obtidos. Por isso, acharam que este facto se deve a alteração da expressão génica e não aos rearranjos genómicos.

Nesta perspectiva, diversos estudos genéticos puseram à disposição da comunidade científica informações assegurando a possibilidade de construção de sondas de DNA específicas para os serotipos, utilizando a região central do gene da flagelina nas estirpes de *Campylobacter* spp. (Alm *et al.*, 1993).

Segundo Wassenaar & Newell (2000), o desenvolvimento dos “primers” a ser utilizados na amplificação de *flaA* devem basear-se em: (i) sequências do gene disponíveis; (ii) detecção máxima dos polimorfismos; (iii) presença de bases G e C na posição final para aumentar a estabilidade de “annealing”; e (iv) região variável, já referida, que provou ter valor discriminativo para um grande número de estirpes.

Porém, de acordo com resultados de alguns autores, é caso para dizer que este gene não é específico para uma única espécie deste género, pois diversos “primers” tais como RAA19 (Alm *et al.*, 1993) e Pg50 (Oyofo *et al.*, 1992), frequentemente utilizados na amplificação do gene *flaA* e que foram construídos para *C. jejuni*, amplificam também para outras espécies como *C. lari*, *C. upsaliensis* e *C. sputorum* (Nachamkin *et al.* 1996; Waegel & Nachamkin, 1996), e *C. coli* e *C. helveticus* (Owen *et al.* 1993).

Em consequência disso, a amplificação do gene *flaA* permitiu o desenvolvimento da chamada técnica de PCR-*flaA* que na realidade pode ser utilizada para detectar a presença ou ausência de bactérias do género *Campylobacter* em diferentes ambientes ou fontes (Oyoyo & Rollins, 1993).

No entanto, a variabilidade da região central do gene *flaA* levou ao desenvolvimento e introdução da técnica de análise RFLP-*flaA*, que consiste na digestão do produto de amplificação resultante de PCR, utilizando enzimas de restrição de corte frequente. Nas bactérias do género *Campylobacter*, esta técnica foi aplicada pela primeira vez em estirpes de *C. jejuni*.

Numerosos trabalhos realizados sobre os genes da flagelina (*flaA* e *flaB*) demonstram quanto é importante a digestão de *flaA* na discriminação de estirpes de *Campylobacter* spp. e as enzimas utilizadas para digerir os produtos de amplificação diferem significativamente, pelo que o seu uso, quer simples ou misto, é determinante no grau de discriminação que pode ser alcançado para cada experiência (Klena, 2001).

Portanto, a discriminação obtida por RFLP-*flaA* entre estirpes de *Campylobacter* spp. depende muito das enzimas utilizadas. Neste sentido, utilizando a enzima *HinfI* obteve-se uma discriminação baixa entre estirpes (Owen *et al.*, 1994), enquanto que foi possível aumentar a discriminação com as enzimas *DdeI* e *AluI* (Alm *et al.* 1993; Birkenhead *et al.*, 1993; Nachamkin *et al.*, 1993). Porém, segundo Alm *et al.* (1993), uma digestão dupla com as enzimas *PstI* e *EcoRI* pode aumentar os níveis de diferenciação entre as estirpes de *Campylobacter* spp.

Muitos trabalhos existentes (Nachamkin *et al.*, 1996; Misawa *et al.*, 1998) demonstram que a tipificação a partir do gene da flagelina pode distinguir entre estirpes que parecem serologicamente idênticas mas, para alguns casos, existe uma correlação entre esta técnica e a serotipagem. A análise de variabilidade de *flaA* é considerada uma técnica muito importante para a tipificação das estirpes de *Campylobacter* spp. em casos de surtos, particularmente quando dados de sequência nucleotídica são gerados (Meinersman *et al.*, 1997).

Por outro lado, a ocorrência de recombinações inter-genómicas ou intra-genómicas dentro dos genes pode ser responsável pela instabilidade dos padrões com o decorrer do tempo (Harrington *et al.*, 1997). Por isso, recomenda-se um cuidado especial na interpretação de resultados baseados em dados de PCR-RFLP *flaA* a longo termo (Klena, 2001), considerando ainda a possibilidade de que esta técnica seja utilizada em combinação com outros métodos para a confirmação dos resultados obtidos.

Apesar de relativamente simples e segura, esta técnica tem falhado na reprodutibilidade, pois as variações de procedimento registadas entre os diferentes laboratórios impedem a comparação dos resultados obtidos (Wassenaar & Newell, 2000).

Contudo, a tipificação por gene da flagelina tem demonstrado também ser aplicável para a maioria das estirpes de *C. coli* e algumas estirpes de outras espécies como *C. lari* e *C. helveticus* (Owen *et al.*, 1993).

A nível de espécies, a técnica de RFLP-*flaA* tem demonstrado capacidade de identificação, podendo por isso distinguir entre as estirpes de *C. jejuni* e *C. coli*. Sendo assim, alguns autores como Comi *et al.* (1996), utilizando as endonucleases *AluI* e *HinfI*, conseguiram seleccionar perfis específicos correspondentes a estas espécies.

2.2.2. Procedimento experimental

1. Reacções de amplificação

Os produtos de amplificação do gene da flagelina (*flaA*) foram obtidos, utilizando o “primer” RAA19 (5'-GCACCYTTAAG(A/T)GTRGTTACACCCTGC-3'; Alm *et al.*, 1993) e o “primer” Pg50 (5'-ATGGGATTTCTGTATTAAC-3', Oyoyo *et al.*, 1992).

As misturas de reacção utilizadas na amplificação do gene *flaA* foram preparadas num volume total de 50 µl, incluindo 2,5 µl de cloreto de magnésio 50 mM, 5 µl de tampão de PCR 10X, 1 µl de dNTPs 10 mM, 0,4 µl de cada “primer” 50 mM e 0,2 µl de Taq DNA polimerase 5 U/µl (Invitrogen), 35,5 µl de água ultrapura e 5 µl de amostra de DNA. As condições de amplificação usadas no termociclador Robocycler (Stratagene) estão descritas na TABELA 3.12.

Ação	Temperaturas	Período	N.º de ciclos
Desnaturação inicial	95°C	3'	1
Desnaturação	95°C	1'	
“Annealing”	45°C	1'	30
Extensão	72°C	1'	
Extensão final	72°C	5'	1

TABELA 3.12:
Programa de amplificação utilizado na análise do gene da flagelina *flaA*.

O produto de amplificação de cada amostra de DNA obtido nas reacções de PCR foi visualizado em gel de agarose a 1%. O processo de electroforese durou cerca de duas horas, e foi aplicada (em cada poço do gel) uma quantidade de 5 µl do produto de reacção.

2. Restrição por endonucleases dos fragmentos amplificados

Os fragmentos amplificados correspondentes às regiões do gene *flaA* foram em seguida submetidos a uma digestão dupla pela técnica RFLP-*flaA* (Restriction Fragment Length Polymorphism), utilizando as enzimas de restrição *EcoR I* e *Pst I*.

Para cada estirpe em estudo, procedeu-se à digestão de 10 µl do produto de amplificação num volume de 20 µl com 5 U de cada uma das enzimas de restrição e 1X o tampão de enzima, de acordo com as instruções do fabricante

Na TABELA 3.13 apresentam-se as endonucleases utilizadas na digestão do gene da flagelina, com os respectivos tampões e sequências de corte.

Enzimas de restrição	Tampão de enzima	Fabricantes	Sequências de corte
<i>EcoR</i> I	EcoR I	Biolabs	G↓AATTC
<i>Pst</i> I	EcoR I	Biolabs	CTGCA↓G

TABELA 3.13:
Endonucleases utilizadas na digestão dos amplicões do gene *flaA*.

A digestão foi efectuada “overnight” a 37°C, em banho. Tal como descrito para a análise de ITS-ARDRA, optou-se pela utilização directa dos produtos de PCR na reacção de restrição.

3. Observação dos perfis obtidos por electroforese

Os fragmentos resultantes da reacção foram separados em géis de agarose a 1,2% nos quais foram aplicados 10 µl da reacção de digestão. A electroforese decorreu durante 2 horas e 30 minutos, a 90 V e em TBE 0,5X. Depois, o gel foi corado com brometo de etídio e a imagem recolhida e digitalizada com o programa informático KODAK 1D 2.0.

2.2.3. RESULTADOS

Tendo em consideração as dificuldades encontradas na análise dos resultados obtidos neste ensaio, relativamente ao que concerne a interpretação das bandas ou fragmentos de restrição dos amplicões da região do gene da flagelina (*flaA*), optou-se pelo mesmo procedimento estratégico utilizado na análise dos resultados obtidos com a técnica de ITS-ARDRA.

Também pelas mesmas razões já invocadas na análise de ITS-ARDRA, apenas foi possível obter resultados interpretáveis para 179 dos 187 isolados inicialmente incluídos neste estudo. Na FIGURA 3.4 exemplificam-se alguns perfis de RFLP-*flaA* encontrados entre as 179 estirpes de *C. jejuni* e *C. coli* analisadas neste ensaio.

Após o tratamento dos géis de agarose com o sistema de captura de imagem KODAK, recorreu-se ao software BioNumerics (Applied Maths) para a análise densitométrica dos perfis de restrição do amplicão do gene *flaA*. Com este programa foi possível normalizar os géis, usando como referência o marcador de massa molecular (100bp Gibco BRL).

Após estimativa das massas moleculares dos diferentes fragmentos e exportação subsequente para uma folha de cálculo (EXCEL), procedeu-se ao agrupamento visual dos perfis detectados.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 M

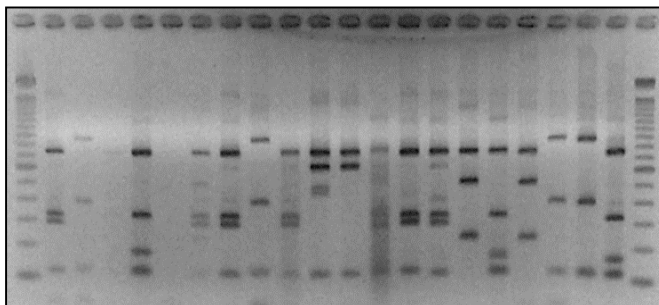


FIGURA 3.4:

Perfis obtidos por digestão dupla dos amplificados do gene da flagelina, utilizando as endonucleases *Pst*I e *Eco*RI.

M: marcador molecular (100 bp DNA ladder); 1: S05; 2: S06; 3: S07; 4: S08; 5: S11; 6: S12; 7: S15; 8: S16; 9: S17; 10: S19; 11: S21; 12: S23; 13: S28; 14: S31; 15: S32; 16: S33; 17: S35; 18: S36; 19: S37.

Seguidamente determinaram-se as médias e os desvios padrão das dimensões moleculares dos diferentes fragmentos. Desta análise resultou a definição de 11 perfis de restrição experimentais distintos. Em paralelo, uma consulta “online” através do “site” da NCBI permitiu obter informações sobre as sequências do gene *flaA*, quer completas, quer parciais, de algumas estirpes de referência das espécies em estudo (*C. jejuni* e *C. coli*).

Na TABELA 3.14, apresentam-se algumas estirpes de referência pertencentes às espécies *C. jejuni* e *C. coli*, cujas sequências se encontram disponíveis no GenBank e que foram utilizadas na análise dos resultados obtidos com a técnica de RFLP-*flaA*.

O tratamento das sequências disponíveis permitiu gerar os perfis teóricos de restrição (restritos “*in silico*”), recorrendo ao programa NEBCUTTER (New England Biolab, <http://www.neb.com>). Tal como na restrição experimental, a digestão teórica do produto de amplificação do gene *flaA* envolveu as mesmas endonucleases (*Pst*I e *Eco*RI), tendo sido seleccionadas 39 sequências (sendo 2 de *C. coli* e 37 de *C. jejuni*), das quais resultaram 15 perfis simbolicamente representados e identificados de A a O. Estes restritos “*in silico*” encontram-se sumarizados na TABELA 3.13.

Como se pode observar na TABELA 3.14, cada um dos perfis detectados é exclusivamente formado por estirpes da mesma espécie, sendo os perfis H e M com 7 isolados cada, os mais predominantes. A seguir, foram definidos perfis com 4 (F e J), 3 (G e L) e 2 (I e N) estirpes, respectivamente. Os restantes perfis detectados apenas incluíam uma estirpe. As duas únicas estirpes de *C. coli* incluídas nesta análise mostraram perfis distintos. Se a estirpe RM2228 apresenta características que a colocaram num agrupamento distinto de todas estirpes em análise, o mesmo não se verificou com a outra estirpe de *C. coli* (Japan27) que, pelo número e dimensões moleculares dos fragmentos se agrupou com as estirpes D935 e D5490 de *C. jejuni* no perfil L.

TABELA 3.14:

Resultados da análise “*in silico*” de sequências do gene *flaA* de estirpes de referência de *C. jejuni* e *C. coli*.

N.º acesso GenBank	Espécie	Estirpe	Sequência disponível (bp)	Sequência analisada (bp)	Perfil de restrição <i>Pst</i> I + <i>Eco</i> R I Ordem dos mapas 5' → 3'						RT
Z29327	<i>C. jejuni</i>	TGH9011 a)	1728	1424	1308	116					A
AY751740	<i>C. jejuni</i>	T1016 b)	1595	1360	137	1223					B
AF050194	<i>C. jejuni</i>	L19 c)	1728	1424	204	1220					C
AB098068	<i>C. jejuni</i>	Nls584 d)	1722	1424	1020	288	116				D
AF050190	<i>C. jejuni</i>	D2640 e)	1731	1427	204	202	998	23			E
AF050184	<i>C. jejuni</i>	A74/O e)	1731	1427	406	998	23				F
AF050191	<i>C. jejuni</i>	D2677 e)	1731	1427	406	998	23				F
AF050195	<i>C. jejuni</i>	SSU9894 e)	1731	1427	406	998	23				F
J05635	<i>C. jejuni</i>	81116 f)	1854	1427	406	998	23				F
AF290501	<i>C. jejuni</i>	86-1 g)	1728	1430	93	111	831	395			G
AF290502	<i>C. jejuni</i>	86-2 g)	1728	1430	93	111	831	395			G
AF290503	<i>C. jejuni</i>	86-3 g)	1728	1430	93	111	831	395			G
AF369581	<i>C. jejuni</i>	D5497 h)	1671	1424	204	831	389				H
AF369587	<i>C. jejuni</i>	D5477 h)	1671	1424	204	831	389				H
AF290496	<i>C. jejuni</i>	O19 g)	1722	1424	204	831	389				H
AF290497	<i>C. jejuni</i>	HL77 g)	1722	1424	204	831	389				H
AF290498	<i>C. jejuni</i>	HL84 g)	1722	1424	204	831	389				H
AF290499	<i>C. jejuni</i>	OH4382 g)	1722	1424	204	831	389				H
AF290500	<i>C. jejuni</i>	OH4384 g)	1722	1424	204	831	389				H
AB103060	<i>C. jejuni</i>	Nls562 d)	1716	1418	204	202	250	739	23		I
M26945	<i>C. jejuni</i>	VC167 i)	1719	1415	204	202	247	739	23		I
AF369582	<i>C. jejuni</i>	D5498 h)	1662	1415	699	609	107				J
AF369585	<i>C. jejuni</i>	D5493 h)	1662	1415	699	609	107				J
AF369586	<i>C. jejuni</i>	D5494 h)	1662	1415	699	609	107				J
AB098070	<i>C. jejuni</i>	JCM2013 j)	1713	1415	699	609	107				J
BLAST WG	<i>C. jejuni</i>	RM1221 k)	1722	1418	699	585	134				K
AB098069	<i>C. coli</i>	Japan27 l)	1722	1424	699	498	227				L
X57173	<i>C. jejuni</i>	Li7 m)	1731	1427	699	501	227				L
AF050186	<i>C. jejuni</i>	D935 e)	1728	1424	699	498	227				L
AF369583	<i>C. jejuni</i>	D5490 h)	1674	1427	699	321	291	116			M
AF369584	<i>C. jejuni</i>	D5492 h)	1668	1421	699	321	288	113			M
BLAST WG	<i>C. jejuni</i>	NCTC11186 n)	1719	1415	699	321	288	107			M
AF050188	<i>C. jejuni</i>	D2290 e)	1719	1415	699	321	288	107			M
AF050192	<i>C. jejuni</i>	L17 e)	1719	1415	699	321	288	107			M
AF050196	<i>C. jejuni</i>	SSU9896 e)	1719	1415	699	321	288	107			M
AF050197	<i>C. jejuni</i>	D1118 e)	1719	1415	699	321	288	107			M
AB103061	<i>C. jejuni</i>	Nls563 d)	1725	1427	699	321	273	18	116		N
AF050185	<i>C. jejuni</i>	D772 e)	1731	1427	699	321	273	18	116		N
BLAST WG	<i>C. coli</i>	RM2228 o)	1731	1427	699	321	162	18	111	116	O

a) Chan *et al.* unpublished, b) Pope *et al.* unpublished, c) Meinersmann *et al.* (2000), d) Gondo *et al.* unpublished, e) Meinersmann *et al.* (2000), f) Nuijten *et al.* (1990), g) Tsang *et al.* (2001), h) Fitzgerald *et al.* (2001), i) Logan *et al.* (1989), j) Sekizuka *et al.* (2002), l) Fouts *et al.* (2005), m) Fischer *et al.* (1991), n) Parkhill *et al.* (2000), o) Fouts *et al.* unpublished. RT: restritos definidos por análise “*in silico*”.

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
1308	1223	1220	1020	998	998	831	831	739	699	699	699	699	699	699
116	137	204	288	204	406	395	389	247	609	585	498	321	321	321
		116	202	23	111	204	204	107	134	227	288	273	162	
			23		93			202			107	116	116	
								23				18	111	
														18

TABELA 3.15:

Perfis de restrição “*in silico*” obtidos com as endonucleases *Pst*I e *Eco*RI na digestão dupla dos amplicões do gene *flaA*.

Quanto aos perfis de restrição obtidos com a digestão dupla de *flaA* neste ensaio, tal como no caso de análise que envolveu a restrição dos produtos de amplificação dos ITS, foram estabelecidos critérios que permitiram que os 11 perfis de restrição obtidos fossem designados, como é referido, por perfis experimentais, adoptando-se as letras PE (*Pst* I e *EcoR* I) seguidas de um número correspondente à sua ordem de detecção e terminando com a letra A.

Na TABELA 3.16 apresentam-se os perfis de restrição experimentais (PE1A a PE11A) detectados e os valores médios e desvios padrão dos respectivos fragmentos ou bandas.

PE1A	PE2A	PE3A	PE4A	PE5A	PE6A	PE7A	PE8A	PE9A	PE10A	PE11A
m s	m s	m s	m s	m s	m s	m s	m s	m s	m s	m
958 11	865 23	764 5	760 5	748 16	743 15	737 8	717 16	649 7	643 13	637
494 9	400 11	301 4	525 6	332 8	333 8	452 13	395 8	341 6	331 5	214
98 6	123 6	301 4	251 2	176 10	295 8	118 6	113 3	303 10	164 6	173
				124 7	122 7		113 3	121 2	116 6	127
									116 6	127

TABELA 3.16:
Perfis de restrição experimentais do amplicão *flaA* obtidos com as endonucleases *Pst*I *EcoR*I.

m e s: valor médio e desvio-padrão (bp), calculados no conjunto de estirpes com o mesmo perfil

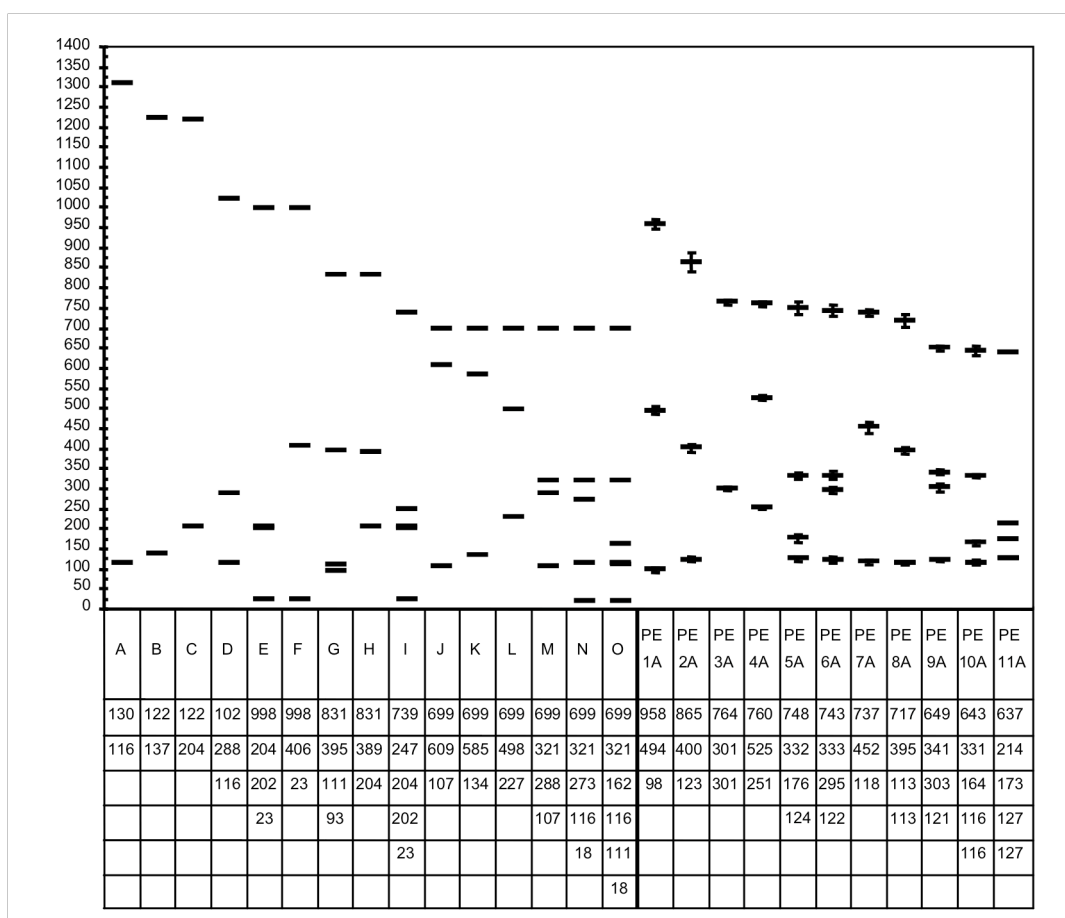
No conjunto, os fragmentos de restrição encontrados entre os isolados de *Campylobacter* que foram objecto deste estudo variaram entre 98 e 958 bp. Em todos os perfis verificou-se a presença de pelo menos 3 fragmentos, variando os de maior peso molecular entre 637 e 958 bp nos diferentes perfis detectados, enquanto que nos da série 3, enquanto que as massas moleculares dos menores fragmentos variaram entre 98 e 301 bp.

A comparação entre os perfis teóricos A a O (resultados “*in silico*”) e os restritipos experimentais (PE1A a PE11A), ilustrada graficamente na FIGURA 3.6, permitiu constatar que não houve perfis equivalentes entre estas duas análises, pelo que todos os perfis detectados neste “screening” foram considerados únicos para este estudo.

Com a aplicação destas técnicas, e atendendo os objectivos deste trabalho, esperava-se identificar e diferenciar as estirpes das 187 estirpes de *C. jejuni* e *C. coli* envolvidas neste estudo. Mas, como já foi referido, apenas foi possível aplicar RFLP-*flaA* a 179 dos 187 isolados, pelo que a capacidade de tipificação obtida foi de 95,7%.

Analisando a distribuição dos 179 isolados nos 11 perfis distintos detectados com a técnica de RFLP-*flaA*, verifica-se que o perfil PE10A é o mais frequente, com 60 isolados (33,5%), seguido dos perfis PE2A (16,8%), PE8A (14%), PE5A (10,1%), PE6A (7,3%), PE1A (5,6%), e PE3A (5%). Os perfis PE4A, PE7A e PE11A agrupam, em cada um, 2,2% da totalidade das estirpes. Por fim, o perfil PE9A com 1,1% das estirpes foi o menos frequente de todos (TABELA 3.17).

FIGURA 3.5:

 Representação gráfica dos perfis de restrição "in silico" (A a O) e restritos experimentais (PE1A a PE11A) de RFLP-*flaA*.


	PE1A	PE2A	PE3A	PE4A	PE5A	PE6A	PE7A	PE8A	PE9A	PE10A	PE11A	Σ
<i>C. jejuni</i>	9	20	9	4	10	7	3	20	0	12	3	97
<i>C. coli</i>	1	10	0	0	8	6	1	5	2	48	1	82
Σ	10	30	9	4	18	13	4	25	2	60	4	179

PE1A a PE11A: perfis experimentais; ND: não determinado.

ND	Σ
4	101
4	86
8	187

 TABELA 3.17: Distribuição dos isolados de cada espécie pelos perfis de RFLP-*flaA* obtidos com digestão dupla *Pst*I e *Eco*RI.

As 97 estirpes de *C. jejuni* analisadas distribuem-se por 10 grupos, dos quais os tipos PE2A e PE8A com 20,6% de isolados cada são predominantes, seguidos dos tipos PE10A com 12,4%, PE5A com 10,3%, PE3A com 9,3% e PE6A com 7,2% de isolados, respectivamente. Nos restantes perfis experimentais, o número de estirpes por grupo varia entre 3 e 4.

Os perfis identificados na digestão dupla com as enzimas *Pst*I e *Eco*RI, na sua maioria incluem estirpes de *C. jejuni* e *C. coli*. No entanto, os perfis experimentais PE3A, PE4A e PE9A são os únicos que incluem apenas uma espécie. Assim, apesar dos números muito reduzidos de estirpes que constituem cada um destes perfis, verificou-se que PE3A e PE4A são exclusivamente formados por *C. jejuni*, enquanto que em PE9A encontram-se apenas estirpes de *C. coli*.

Relativamente a *C. coli*, verifica-se que as estirpes encontram-se distribuídas em 9 dos 11 perfis detectados (menos um que *C. jejuni*), dos quais PE10A é o mais comum com 58,5% dos isolados desta espécie. A seguir, os outros perfis com mais isolados são PE2A, PE5A, PE6A e PE8A representados por 12,2%, 9,8%, 7,3% e 6,1% dos isolados, respectivamente, enquanto que nos restantes perfis detectados com este ensaio, este número foi bastante reduzido variando entre 1 ou 2 isolados por agrupamento.

2.3. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO

A fiabilidade e a robustez de um método de diferenciação depende muito da sua capacidade de diferenciar os isolados em estudo, permitindo o seu agrupamento quando partilham características semelhantes ou distingui-los quando são diferentes. A avaliação do potencial de diferenciação dos métodos de análise de polimorfismos de restrição (ITS-ARDRA e RFLP-*flaA*), aplicados neste trabalho a isolados de *C. jejuni* e *C. coli*, realizou-se recorrendo a alguns parâmetros como a capacidade de tipificação, a reprodutibilidade, e o poder de discriminação.

Relativamente à capacidade de tipificação (CT), e tendo em conta o descrito nos pontos anteriores, a técnica de RFLP-*flaA* (CT = 95,7%) revelou-se com maior aplicabilidade do que a técnica de ITS-ARDRA (CT = 89,8%). Na maioria dos isolados para os quais não foi possível obter resultados (19 em ITS-ARDRA e 8 em RFLP-*flaA*, de um conjunto total de 187 isolados), a razão maioritária prendeu-se com a ocorrência de restrições inespecíficas e parciais que impossibilitaram uma análise fidedigna dos resultados.

2.3.1. REPRODUTIBILIDADE DAS TÉCNICAS

Para que os resultados obtidos em testes experimentais, particularmente quando estes envolvem uma análise numérica, sejam considerados válidos e fiáveis, é extremamente importante que seja assegurado o controlo da reprodutibilidade, pois como se sabe, tanto a validade da informação produzida como as interpretações subsequentes dependem muito deste parâmetro.

Por isso, é sempre imprescindível o controlo de todas as etapas do procedimento experimental que, no caso da taxonomia microbiana molecular vão desde a cultura e crescimento dos microrganismos, até às condições técnicas de aplicabilidade dos procedimentos referentes à amplificação do material genético e à electroforese, passando pela extracção de DNA e todos os outros procedimentos julgados necessários para as experiências em questão.

Desta forma, só os métodos adequadamente padronizados permitem atingir o nível máximo de reprodutibilidade. Assim sendo, para a avaliação da reprodutibilidade dos métodos de análise por ITS-ARDRA e RFLP-*flaA*, e de acordo com o recomendado por Sneath & Johnson (1972), 19 isolados num total de 187 foram aleatoriamente seleccionados e cada um deles tratado em duplicado, como se de duas amostras (isolados) diferentes se tratasse, em todas as etapas envolvidas no processo experimental em execução.

As abordagens genómicas ITS-ARDRA e RFLP-*flaA* envolveram a digestão de fragmentos de PCR com endonucleases, sendo a primeira simples com *Sau* 3AI e *Hae*III, respectivamente, e a segunda uma digestão dupla com *Pst*I e *Eco*RI. A reprodutibilidade de cada um destes ensaios foi estimada calculando a média dos valores percentuais de semelhança a que se agrupam os perfis de cada par de réplicas num dendrograma construído apenas para estes perfis.

Com base neste procedimento de análise de resultados, a reprodutibilidade foi estimada em 64% para ITS-ARDRA com *Sau*3AI e com *Hae*III e em 54% para RFLP-*flaA* com digestão dupla *Pst*I-*Eco*RI. Estes reduzidos valores de reprodutibilidade resultam maioritariamente da análise efectuada pelo software BioNumerics que, ao efectuar a integração densitométrica e normalização dos perfis electroforéticos, é extremamente sensível a variações apreciáveis na intensidade de coloração geral dos géis (efeito de “background”) e a distorções ou diferenças de resolução electroforética verificadas entre géis distintos.

No entanto, com a estratégia de análise de resultados adoptada e que consistiu em utilizar o software apenas para estimativa das massas moleculares de cada fragmento, foi possível verificar que a reprodutibilidade efectiva das técnicas era francamente superior. De facto, a análise das TABELAS 3.9 e 3.10 (referentes a ITS-ARDRA) e da TABELA 3.16 (referente a RFLP-*flaA*) permite verificar que os coeficientes de variação [$CV\ (\%) = (m/s) \times 100$] encontrados para a estimativa das massas moleculares de cada fragmento se situam na gama de 0,7 – 6,1% para ITS-ARDRA e de 1,3 - 26,6% para RFLP-*flaA*. No entanto, para RFLP-*flaA* esta gama reduz-se a 1,3 – 10,4%, se forem excluídos os 7 fragmentos de maior variação entre os 25 fragmentos distintos detectados. Deste modo, pode considerar-se como aceitável a reprodutibilidade associada a estas análises de polimorfismos de restrição.

2.3.2. ÍNDICES DE DIVERSIDADE

O poder discriminante de cada técnica foi determinado baseando-se na distribuição de isolados pelos perfis experimentais (restritos), de acordo com os dados da TABELA 3.11 (ITS-ARDRA) e da TABELA 3.17 (RFLP-*flaA*).

Em termos globais, comparando a eficácia de cada uma das técnicas na discriminação das estirpes em estudo, é evidente que RFLP-*flaA*, com os 11 restritos produzidos, apresentou um maior poder discriminante que ITS-ARDRA, apenas com 4 restritos. Contudo, tendo em conta que o número total de isolados analisados foi diferente em cada uma das técnicas e, sobretudo, que o número de isolados não analisado de cada uma das espécies variou entre técnicas, aplicaram-se os índices de diversidade de Simpson (D; Hunter & Gaston, 1988)) e de Shannon-Wiener (J'; Zar, 1999), calculados de acordo com as equações apresentadas na FIGURA 3.6.

ÍNDICE DIVERSIDADE DE SIMPSON

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \cdot \sum n_j(n_j-1)$$

n_j : nº estirpes do grupo j
 N : nº total de estirpes

ÍNDICE DIVERSIDADE DE SHANNON-WIENER

$$H' = - \sum p_j \ln p_j \quad H'_{\max} = \ln s \quad J' = H' / H'_{\max}$$

p_j : proporção estirpes do grupo j $p_j = n_j / N$
 s : nº total de grupos

FIGURA 3.6:
Equações matemáticas
utilizadas na determinação
dos índices de diversidade.

Estes índices, tendo em conta a distribuição de isolados por grupos, permitem uma comparação directa em situações de desigual número de isolados em análise e fornecem informação adicional e complementar. De facto, o índice de Simpson representa a probabilidade de dois isolados seleccionados consecutivamente pertencerem ao mesmo tipo, enquanto que o índice de Shannon-Wiener avalia a equidade da distribuição de isolados pelos diferentes tipos. Embora ambos os índices variem entre o máximo de 1 e o mínimo de zero, o valor $D=1$ corresponde à situação em que cada tipo só apresenta um isolado, enquanto que $J' = 1$ corresponde a qualquer distribuição perfeitamente equitativa dos isolados pelos diferentes tipos. Para que estes índices apresentem o valor mínimo ($D = H' = 0$), é necessário que ocorra a total identidade dos isolados (um único tipo).

Nas TABELAS 3.18 e 3.19 apresentam-se os valores dos índices de Simpson (D) e Shannon Wiener (J) obtidos com as técnicas de ITS-ARDRA e RFLP-*flaA*, respectivamente.

Espécie	Índice de diversidade	Valores estimados	n.º total estirpes	n.º de grupos
<i>C. jejuni</i>	D	0,54	94	3
	J'	0,82		
<i>C. coli</i>	D	0,73	74	4
	J'	0,95		
Global	D	0,70	168	4
	J'	0,91		

TABELA 3.18:

Valores dos índices de Simpson (D) e de Shannon-Wiener (J) estimados na análise das estirpes de *C. jejuni* e *C. coli* por ITS-ARDRA

Espécie	Índice de diversidade	Valores estimados	n.º total estirpes	n.º de grupos
<i>C. jejuni</i>	D	0,88	97	10
	J'	0,90		
<i>C. coli</i>	D	0,64	82	9
	J'	0,63		
Global	D	0,82	179	11
	J'	0,83		

TABELA 3.19:

Valores dos índices de Simpson (D) e de Shannon-Wiener (J) estimados na análise das estirpes de *C. jejuni* e *C. coli* por RFLP-*flaA*

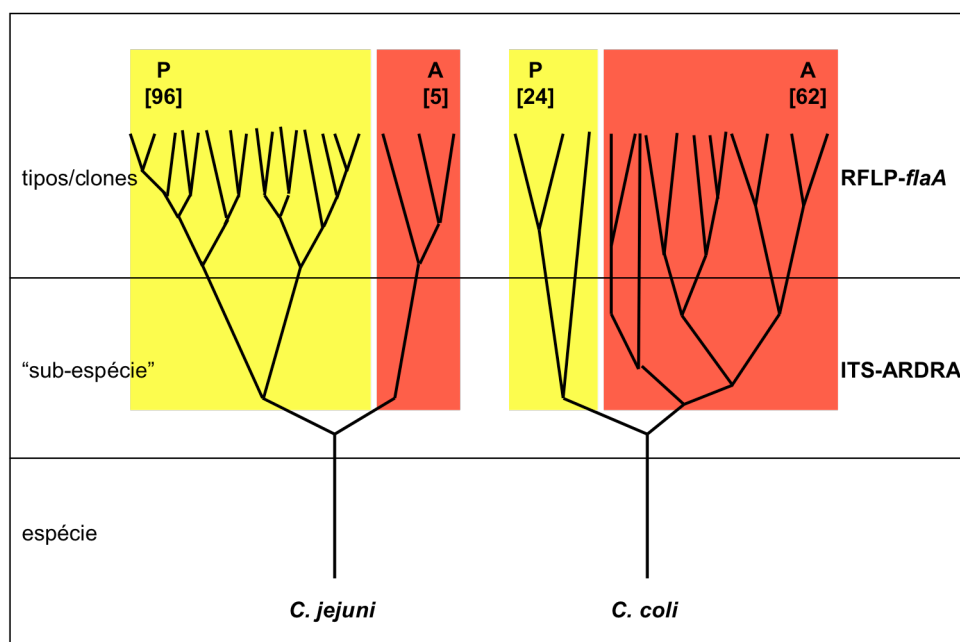
Analisando os valores dos índices D e J' obtidos globalmente para cada técnica, verifica-se que RFLP-*flaA* apresenta um maior valor de D, o que era expectável tendo em conta o maior número de tipos encontrados com RFLP-*flaA* (11) relativamente a ITS-ARDRA (4), mostrando assim o maior poder discriminante desta técnica. No entanto, o valor de J' é menor para RFLP-*flaA*, o que implica uma menor equidade na distribuição dos isolados por tipos, ou seja, apesar de existirem mais tipos com RFLP-*flaA*, a distribuição de isolados por tipos é mais heterogénea que em ITS-ARDRA.

Se os valores dos índices de diversidade forem analisados separadamente para cada espécie em estudo, verifica-se que o potencial discriminante das técnicas varia com a espécie. De facto, em *C. jejuni*, RFLP-*flaA* apresenta valores superiores a ITS-ARDRA para ambos os índices, enquanto que em *C. coli* se observa a situação inversa. Em termos globais, observa-se portanto maior diversidade a nível da região ITS em *C. coli*, enquanto que em *C. jejuni* se observa maior diversidade a nível do gene da flagelina (*flaA*).

No entanto, e apesar do efeito normalizador dos índices de diversidade relativamente a diferenças no número de isolados em análise, a interpretação dos valores destes índices revela-se mais complexa devido à desigualdade de distribuição dos isolados por espécies (101 de *C. jejuni* e 86 de *C. coli*) e, sobretudo, por proveniência: 67 de Angola, dos quais 62 de *C. coli*, e 120 de Portugal, dos quais 96 de *C. jejuni*. Assim, na FIGURA 3.7 apresenta-se um esquema hipotético da diversificação dos isolados em estudo, em função da espécie e origem.

FIGURA 3.7:

Esquema hipotético da diversificação dos isolados de *C. jejuni* e *C. coli* *



*: o esquema não reflecte a proporcionalidade do número de isolados; P: Portugal; A: Angola

Considerando a maior conservação das regiões ITS, que por isso apresentam geralmente potencial taxonómico, sendo usadas para classificação a nível de espécie ou sub-espécie, e sabendo que o gene *flaA* está sujeito a taxas de mutação mais elevadas (nomeadamente por recombinação intra e intergénica), que se traduzem por fenótipos com distintas propriedades antigénicas e, consequentemente, com maior potencial adaptativo como resposta a pressões selectivas ambientais (nomeadamente antibióticos), a inversão dos níveis de diversidade observada entre *C. jejuni* e *C. coli* quando se comparam as duas técnicas de ITS-ARDRA e RFLP-*flaA*, pode significar que:

- (i) no conjunto de isolados de *C. coli* existe um maior número de sub-populações com níveis de divergência mais ancestrais (representadas na FIGURA 3.7 por ramos divergentes ao nível sub-específico) do que no conjunto de isolados de *C. jejuni*, justificando assim a maior diversidade detectada por ITS-ARDRA em *C. coli*;
- (ii) a taxa de mutação em *flaA* é maior em *C. jejuni* do que em *C. coli*, traduzindo-se por maior variabilidade de tipos/clones e consequentemente por maior diversidade detectada por RFLP-*flaA* em *C. jejuni*;
- (iii) Adicionalmente, e tendo em conta que os isolados de *C. coli* são maioritariamente provenientes de aviários de Angola, com processos de produção menos controlados e portanto com maior tendência para disseminação horizontal de microrganismos, a proliferação de alguns clones mais adaptados justificaria os menores valores de J' (predominância relativa de alguns tipos) que estão associados a RFLP-*flaA* em *C. coli*.

Na verdade, a análise de polimorfismos do gene *flaA* em *C. jejuni* e *C. coli* tem sido objecto de diversos estudos (Comi *et al.*, 1996; Harrington *et al.*, 1997; Fitzgerald *et al.*, 2001; Wittwer *et al.*, 2005; Cardinale *et al.*, 2006; Zorman *et al.*, 2006). Por isso, sabe-se que o poder de discriminação da RFLP-*flaA* depende do tipo e da capacidade das enzimas utilizadas para digerir o fragmento de amplificação da sequência deste gene, bem como das espécies e origem dos isolados em estudo.

Embora pareça ideal a utilização de mais de que uma endonuclease, como sugerem alguns investigadores (Alm *et al.*, 1993), como meio para aumentar a discriminação entre as estirpes, existem casos em que uma única enzima pode ser suficiente para obter um elevado número de perfis e muitas vezes identificar ou discriminar estirpes de espécies diferentes. Esta situação foi demonstrada no trabalho de Fitzgerald *et al.* (2001) ao longo do qual foram detectados em 315 isolados de *C. jejuni* e *C. coli*, 35 perfis distintos numa digestão simples com a enzima *HinfI*, contrastando com os 26 perfis obtidos com as endonucleases *EcoRI* e *PstI*.

A aplicabilidade de RFLP-*flaA* na tipificação de *Campylobacter* spp. foi igualmente testada em comparação com outras técnicas como a análise de AFLPs e a macrorestrição por PFGE. Assim, Wittwer *et al.* (2005) analisaram a diversidade genética de isolados de *C. jejuni* e *C. coli*, provenientes de aviários na Suíça, tendo detectado por AFLPs maior diversidade em *C. jejuni* (37% de semelhança entre perfis) do que em *C. coli* (70% de semelhança entre perfis).

Embora RFLP-*flaA* apresentasse globalmente um poder discriminante de 40% relativamente a AFLPs, estes autores aplicaram RFLP-*flaA* como sub-tipagem de 20 tipos AFLP que permitiu discriminar 59 tipos AFLP/RFLP-*flaA*, a maioria dos quais correspondendo a *C. jejuni*. Deste modo, confirmou-se a maior variabilidade de *flaA* nesta espécie, tal como referido por outros autores (Harrington *et al.*, 1997).

Por outro lado, Zorman *et al.* (2006) aplicaram paralelamente a análise de macrorestrição com *SmaI* (PFGE) e a análise de RFLP-*flaA* com *CfoI* a 24 isolados de *C. jejuni* e 51 isolados de *C. coli*, provenientes de amostras de carne de frango recolhidas em lojas de distribuição na Eslovénia e Bósnia-Herzegovina. Embora RFLP-*flaA* tenha demonstrado menor poder discriminante que *SmaI*-PFGE, estes autores também observaram uma maior diversidade genética global em *C. jejuni* (30% de semelhança) do que em *C. coli* (60% de semelhança).

Adicionalmente, e em concordância com o descrito nesta dissertação, Zorman *et al.* (2006) observaram com RFLP-*flaA* uma capacidade de tipificação de apenas 83% e a existência de tipos idênticos em ambas as espécies de *Campylobacter*.

No entanto, Cardinale *et al.* (2006) analisaram 99 isolados de *C. jejuni* e 72 isolados de *C. coli* provenientes de frangos no Senegal (aviários e lojas de distribuição), por macrorestrição com *Sma*I e *Kpn*I (PFGE), tendo detectado níveis elevados de diversidade para ambas as espécies (*C. jejuni*: 24 tipos, $D = J' = 0,96$; *C. coli*: 19 tipos, $D = J' = 0,95$), sem predominância de tipos particulares, mas com clones específicos de aviários, sugerindo a existência de múltiplas fontes de infecção em paralelo com a disseminação horizontal a nível de aviário.

Assim, e ainda que a generalidade dos estudos aponte para a maior variabilidade de *C. jejuni* relativamente a *C. coli* e para a aplicabilidade de RFLP-*flaA* como método de tipificação em *Campylobacter* spp., a complexidade da estrutura populacional destas bactérias e o efeito mais ou menos pronunciado de factores extrínsecos, tais como o tipo de amostras utilizado (v.g. amostras fecais ou zaragatoas da superfície da carne), a origem geográfica das amostras, o tipo de produção avícola (nomeadamente em termos de controlo higieno-sanitário) e a pressão selectiva de tratamentos antimicrobianos, justificam a utilização de outros métodos de tipificação que, sendo direccionados para uma análise mais global do genoma, permitam obter “fingerprints” mais fiáveis de cada isolado.

3.1. INTRODUÇÃO

Há mais de duas décadas, vários métodos de “fingerprinting” baseados em PCR têm sido desenvolvidos, tendo como principal objectivo a tipificação ou discriminação dos organismos (Vandame *et al.*, 1996), ainda que possam adicionalmente ser usados para classificação ou identificação a nível de género, espécie e sub-espécie.

No entanto, apesar das condições de amplificação do DNA e dos “primers” utilizados diferirem de uma técnica para outra, estes métodos de “PCR-fingerprinting” foram concebidos e desenvolvidos num princípio de funcionamento básico comum que consiste em duas etapas fundamentais, a saber:

- ✓ A reacção de PCR usando DNAs dos organismos em estudo;
- ✓ O processamento electroforético do produto de amplificação em gel de agarose.

Na verdade, as técnicas de “PCR fingerprinting” consistem na amplificação de diferentes regiões do genoma e o resultado obtido é a visualização de um conjunto de bandas de DNA específico de cada organismo ou estirpe. Estas bandas constituem um “fingerprint”, comparável a uma “impressão digital”, que identifica e/ou discrimina este organismo ou estirpe de todos os outros. Por isso, todas as técnicas com as características deste conjunto receberam a designação de “PCR-fingerprinting”.

As técnicas são simples, rápidas e de custos relativamente baixos em termos de consumíveis, sendo os seus resultados comparáveis com outros métodos moleculares de tipificação (Gibson & Owen, 1998).

Utilizando um único “primer”, ou dois “primers” distintos, como geralmente acontece nas reacções de PCR convencionais, o processo de amplificação tem sempre lugar, na aplicação destas técnicas, quando dois oligonucleótidos do mesmo “primer” (ou um de cada “primer” distinto) hibridam, utilizando duas cadeias opostas de DNA-molde, em locais de “annealing” não distando mais de 4000 a 5000 bp.

No entanto, além das razões acima referidas e que as diferenciam, estas técnicas podem ser divididas em dois grupos distintos, atendendo às regiões do genoma que constituem o alvo para amplificação do DNA.

O primeiro é constituído por duas técnicas amplamente conhecidas que são AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR) e RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). O fundamento básico destas técnicas reside na utilização de um único “primer” que hibrida aleatoriamente em várias regiões diferentes do genoma do organismo.

No entanto, entre as técnicas de análise por AP-PCR e RAPD, a diferença está apenas no número de bases nucleotídicas dos “primers” utilizados, sendo cerca de 30 e 10 bases, respectivamente (Welsh & Mc Celland, 1990; William *et al.* 1990).

O outro grupo dos métodos de “PCR-fingerprinting” inclui as técnicas M13-PCR, Rep-PCR, ERIC-PCR, MSP-PCR e BOX-PCR. No processo de amplificação destas técnicas, ao contrário das primeiras, são utilizados “primers” dirigidos para alvos conhecidos que, geralmente, são dispersos e variáveis em número de cópias no genoma.

É evidente que as técnicas do primeiro grupo não requerem muitos conhecimentos da biologia molecular dos organismos, enquanto que para o segundo grupo exige-se saber um pouco mais, não só sobre as estirpes mas também e sobretudo sobre o tipo e a natureza das sequências repetidas em questão.

Nas bactérias, as regiões-alvo para estas técnicas são sequências repetidas que podem ser encontradas, tal como nos organismos eucariotas, em diferentes locais do genoma. E, para cada uma destas sequências repetidas foram desenvolvidos “primers” específicos para a amplificação destas regiões, sendo o resultado um polimorfismo de “fingerprinting” que caracteriza as estirpes em estudo. No entanto, embora tenham o mesmo suporte funcional, os resultados obtidos e que correspondem ao conteúdo informativo gerado por cada uma destas técnicas de “PCR fingerprinting” pode ser diferente de uma técnica para outra, atendendo ao tipo de “primer” utilizado.

Estes resultados podem ainda variar de acordo com a espécie em estudo, pois depende, maioritariamente, do número e da localização das sequências complementares no genoma da estirpe, que são responsáveis pelo grau de discriminação que as técnicas podem produzir.

Por outro lado, na análise dos polimorfismos de bandas, a temperatura de hibridação do(s) “primer(s)”, as concentrações dos sais ($MgCl_2$) e DNA molde, a dimensão e a sequência do(s) “primer(s)” são os parâmetros que influenciam a reprodutibilidade, o número e a intensidade das bandas ou fragmentos de DNA a obter. E, para responder adequadamente aos objectivos do estudo, deve ser testada mais de que uma técnica de modo a criar condições que ajudem a escolher o método mais eficaz a utilizar.

Em *Campylobacter*, a aplicação de algumas destas técnicas tem dados bons resultados, permitindo a diferenciação entre estirpes da mesma espécie (Hilton *et al.*, 1997; Nielsen *et al.*, 2000; Wassenaar & Newell, 2000; Ono *et al.*, 2003; Scates *et al.*, 2003; Tu *et al.*, 2005; Aşik *et al.*, 2006). Por isso, atendendo os objectivos propostos para esta dissertação, as técnicas de RAPD, Rep-PCR e M13-PCR foram aplicadas às 187 estirpes de *Campylobacter* spp., provenientes de Angola e de Portugal.

3.1.1. RAPD

O método de RAPD é simples e como referido não obriga a grandes conhecimentos prévios do DNA a utilizar para gerar um “fingerprint” genómico dos organismos em estudo. Portanto, sequências nucleotídicas únicas e curtas podem ser amplificadas por PCR sob condições pouco restritas (“low stringency”) para gerar “fingerprints” polimórficos que podem ser usados para, por exemplo, agrupar organismos patogénicos e não patogénicos, diferenciar estirpes ou avaliar a diversidade genética de um determinado grupo taxonómico ou de uma população microbiana.

Por isso, o método de RAPD é usualmente utilizado quando o objectivo de estudo é comparar genomas que partilham caracteres genómicos com elevado grau de similaridade. Neste caso, o método é utilizado quando uma amostragem não direccionada do genoma inteiro é desejada.

Ao contrário das outras aplicações das técnicas de PCR, este método que, em 1990 foi originalmente descrito e publicado por Welsh & Mc Clelland (1990) e por Williams *et al.* (1990), denominando-o por AP-PCR (Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction) e RAPD (Random Amplified Polymorphic DNAs), respectivamente, utiliza oligonucleótidos de sequências aleatoriamente escolhidas como único “primer” contendo cerca 10 a 12 nucleótidos (Akopyanz *et al.*, 1992b).

É de salientar que as diferenças verificadas entre os perfis obtidos representam variações presentes na estrutura de DNA que, podem ser o resultado de “indels” (inserções e deleções) ou mutações pontuais nas sequências de DNAs, ou ainda consequência directa do processo de “annealing” pouco restrito. De facto, como esta técnica é realizada em condições de baixas temperaturas de “annealing”, é permitido o emparelhamento de “primer” em muitos locais do genoma, cuja sequência pode ser apenas parcialmente complementar.

Como este processo de “annealing” imperfeito pode continuar a ocorrer nos vários ciclos de PCR, em paralelo com a amplificação de fragmentos dos ciclos anteriores, gera-se um perfil de fragmentos (bandas) que, além de representarem a aleatoriedade da ocorrência dos “mismatches” referidos, apresentam número e intensidade variáveis para cada DNA alvo e temperatura de “annealing”.

Os “fingerprints” produzidos são um polimorfismo de bandas¹ obtido pela amplificação de segmentos de DNA que podem ser separados e visualizados por electroforese em gel de agarose, associando-se a cada banda obtida um fragmento especificamente diferente no DNA original respectivo.

¹ Tendo em conta o processo aleatório de ligação do “primer” acima descrito, variações na temperatura de “annealing, concentração de DNA alvo, tipo de polimerase usada, etc., são responsáveis pela baixa reprodutibilidade (sobretudo inter-laboratorial) descrita para esta técnica e que, muitas vezes, constitui uma séria limitação à sua utilização em rotina.

E, dado o facto de que diferentes “primers” de sequências aleatoriamente escolhidas determinam diferentes fragmentos de DNA durante a amplificação por PCR, para cada “primer” usado obtém-se um “fingerprint” especificamente diferente. O que significa que para uma mesma amostra de “DNA-molde”, diversos “fingerprints” podem ser obtidos se ela for submetida a várias amplificações por PCR com diferentes “primers”.

Devido à sua elevada sensibilidade, a técnica de RAPD é capaz de diferenciar muitas estirpes consideradas quase similares quando identificadas com outras técnicas, quer fenotípicas, quer moleculares, sendo por isso, uma ferramenta analítica significativa e importante em áreas de aplicação que lhe são apropriadas, nomeadamente a Taxonomia e a Epidemiologia moleculares.

Como exemplos de aplicação da técnica de RAPD no estudo de estirpes de *Campylobacter* spp. salientam-se os seguintes:

- (1) Giessen *et al.* (1996), que tipificaram por RAPD estirpes de *Campylobacter* spp. de origem avícola, demonstrando que uma infecção causada por estas bactérias em quatro aviários envolvidos no estudo tinha fontes ambientais comuns;
- (2) Carvalho *et al.* (2001), utilizando a mesma técnica conseguiram uma caracterização molecular cujos “fingerprints” permitiram agrupar estirpes de *Campylobacter* spp. isoladas de fezes de crianças na Cidade de México, com ou sem sintomas de diarreia, em estirpes invasivas e não-invasivas;
- (3) Tu *et al.* (2005), num estudo da divergência genética de estirpes de *C. fetus*, conseguiram distinguir pelos perfis RAPD estirpes provenientes de mamíferos e de répteis e, com distintos subconjuntos dos “primers” testados, separar as duas sub-espécies, *C. fetus* subsp. *fetus* e *C. fetus* subsp. *venerealis*, bem como os dois serotipos A e B desta espécie.

3.1.2. Rep-PCR e M13-PCR

A informação disponível sobre as sequências repetidas de DNA indica a existência de diversas famílias destas curtas estruturas oligonucleotídicas no genoma bacteriano, das quais os elementos REP (“Repetitive Extragenic Palindrome”), também designados por PUs (“Palindromic Units”), e as sequências ERIC (“Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus”) são as melhores caracterizadas (Ridley, 1998). Outras estruturas semelhantes aos elementos REP foram observadas em diversos grupos bacterianos (Versalovic *et al.*, 1992; Dmiri *et al.*, 1992), embora com sequências de consenso típicas e especificamente diferentes.

As sequências repetidas foram descritas pela primeira vez em Enterobacteriaceae, particularmente nas espécies *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*, e são geralmente constituídas por uma sequência de 38 pares de bases que se encontram aleatoriamente distribuídas em muitas cópias, que variam entre 50 e 1000 num único genoma.

Por sua vez, as diversas cópias encontram-se organizadas em grupos complexos ou “clusters” de mais ou menos 10 cópias (Makino, 1991), podendo os 38 pares de bases acima referidos formar uma ansa (“stem loop”) de sequência estável, mas cuja região central é constituída por uma sub-região de 5 pares de bases de sequência variável (Stern *et al.*, 1984).

Os elementos REP ocorrem frequentemente entre os genes de um operão ou ainda na região terminal deste, podendo ser observados em tandem com orientações opostas entre duas sequências adjacentes nos genomas de muitas espécies bacterianas (Gilson *et al.*, 1984; Stern *et al.*, 1984). Ao contrário dos elementos REP, as sequências ERIC são constituídas por 126 bp cuja localização é observada nas regiões extra-génicas, tendo uma sequência repetida invertida altamente conservada (Hulton *et al.*, 1991; Sharples & Lloyd, 1990).

Apesar da informação veiculada de que estes elementos repetitivos ocupariam entre 0,5 e 1% da sequência cromossómica total, as suas funções permanecem ainda pouco esclarecidas. No entanto, alguns autores têm sugerido a sua participação na terminação e organização do cromossoma e/ou estabilidade do mRNA, assim como o seu papel na regulação e retro-regulação de genes (Stern *et al.*, 1984; Newbury *et al.*, 1987; Stern *et al.*, 1988). Pensa-se também existir uma certa responsabilidade da interacção REP-proteínas sobre o processo de formação das próprias sequências extragénicas repetidas na estrutura de DNA.

De acordo com Gilson *et al.* (1991), a grande diversidade estrutural de REP é toda ela gerada por um processo que assenta na duplicação de uma única sequência existente ou duplete de unidades palindrómicas convergentes, sendo a transposição e as modificações de sequências, tais como a amplificação localizada, as deleções e as conversões de “motifs”, os principais mecanismos de constituição.

É de salientar o papel dos elementos REP na evolução de cromossoma, na medida em que as duplicações cromossómicas, que ocorrem através do processo de recombinação entre dois elementos de REP distantes, podem produzir certos arranjos nas sequências genómicas (Shyamala *et al.*, 1990) e consequentemente permitir a divergência filogenética das espécies ou estirpes.

Partindo do pressuposto que as sequências REP se encontram dispersas no cromossoma ao longo do qual estão separadas por diferentes distâncias, foi possível projectar as sequências repetidas como sítios de ligação de “primers” para PCR. Assim, um conjunto de “primers” baseados nas sequências de consenso REP ou ERIC, exteriormente dirigidos, pode ser utilizado para gerar polimorfismos genómicos das bactérias que contêm estas sequências (Versalovic *et al.*, 1991).

O método de Rep-PCR consiste num processo de amplificação no qual são utilizados dois “primers”, nomeadamente REP1-I e REP2-I ou ERIC1 e ERIC2 (Ridley, 1998), dirigidos para as regiões entre as sequências repetidas.

Este método tornou-se num instrumento que se juntou a muitos outros métodos de “fingerprinting” baseados em PCR e que têm como objectivos principais o estudo de surtos de doenças infecciosas, a tipificação de bactérias patogénicas e a identificação de isolados de casos esporádicos (Versalovic *et al.*, 1991; Streulens *et al.*, 1993; Van Belkum *et al.*, 1993).

O procedimento experimental associado a Rep-PCR torna-se muito mais simples e rápido se forem utilizados directamente lisados celulares, como sugeriram Woods *et al.*, (1993), eliminando deste modo os passos de extracção, purificação e quantificação do DNA genómico. Tal como quaisquer outros métodos moleculares baseados na técnica de PCR, são gerados fragmentos (bandas) que podem ser visualizados em gel de agarose. Como a região entre as sequências repetidas adjacentes é o alvo de amplificação, as bandas obtidas representam os polimorfismos de distâncias entre estas regiões.

Em *Campylobacter*, as sequências REP e ERIC têm sido utilizadas para a tipificação de estirpes, sendo considerada uma excelente ferramenta para as investigações preliminares relacionadas com surtos infecciosos devido a simplicidade e rapidez da sua execução (Gibson & Owen, 1998). Assim, estirpes de *C. jejuni* e *C. upsaliensis* foram tipificadas por aplicação desta técnica (Giesendorf *et al.*, 1994; Iriarte & Owen, 1996; Wassenaar & Newell, 2000; Moser *et al.*, 2001; Lentzsch *et al.*, 2004), que se revelou muito discriminante e com perfis reprodutíveis.

Em comparação com outros métodos, tanto em *C. jejuni* (Iriarte & Owen, 1996) como em *C. upsaliensis* (Lentzsch *et al.*, 2004), constatou-se que esta técnica não foi capaz de identificar os diferentes agrupamentos ou serotipos definidos pela técnica de serotipagem. Todavia, verificou-se que a sua utilização em conjunto com a serotipagem aumenta o poder discriminante e permite uma caracterização mais completa das estirpes. Em *C. upsaliensis* foi ainda possível agrupar, em “clusters” claramente separados, as estirpes de origem europeia e não europeia (Lentzsch *et al.*, 2004).

De modo análogo a RAPD, a técnica de M13-PCR utiliza um único “primer”, csM13, derivado da sequência “core” do gene da proteína III da cápside do bacteriófago M13, sequência essa que se verificou ser repetida em número variável e de forma dispersa no genoma de eucariotas e procariotas (Ryskov *et al.*, 1988; Meyer *et al.*, 1993). De facto, esta curta sequência de 15 nucleótidos, não só pode ser utilizada para detectar sequências repetidas como os microsátélites no DNA dos indivíduos eucariotas, mas também identificar a hipervariabilidade do número de repetições destas pequenas sequências no genoma bacteriano.

Relativamente à reacção de M13-PCR, pode utilizar-se uma temperatura de “annealing” mais (50-55°C) ou menos (36-37°C) restrita, de modo a obter perfis mais direccionados para as zonas repetidas (reduzindo o número de bandas) ou perfis mais abrangentes do genoma (aumentando o número de bandas).

Ainda que não tenham sido encontrados relatos da aplicação de “M13 PCR-fingerprinting” a estirpes do género *Campylobacter*, esta técnica tem sido utilizada com sucesso na tipificação de diversos grupos bacterianos, nomeadamente *Pseudomonas aeruginosa* (Elaichouni *et al.*, 1994), cianobactérias (Valério *et al.*, 2005), *Klebsiella oxytoca* (Conceição *et al.*, 2005) e *Listeria* spp. (Chambel *et al.*, 2007), bem como na análise da diversidade de diversos grupos de leveduras e fungos filamentosos (Meyer *et al.*, 1993; R. Tenreiro, com. pess.).

3.2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.2.1. Reacções de amplificação

Nas TABELAS 3.20, 3.21, e 3.22, mostra-se a composição das misturas de reacção de amplificação utilizadas em cada uma das experiências de “PCR-fingerprinting”. A sequência nucleotídica dos “primers” usados é a seguinte: (i) “primers” 1281 e 1290: 5'-AACGCGCAAC-3' e 5'-GTGGATGCGA-3', respectivamente (Akopyanz *et al.*, 1992b); (ii) “primers” REPI e REPII: 5'-IIICGICGICATCIGGC-3' e 5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3', respectivamente (Ridley, 1998); e (iii) “primer” M13: 5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3' (Meyer *et al.*, 1993).

	Soluções stock	Mistura da reacção	
	Concentração	Volume reagentes	Concent.
Água u.p.		18.55 µl	-
Tampão	10X	2.5 µl	1X
MgCl ₂	50 mM	1.25 µl	2.5 mM
“primer”	50 pmol.µl ⁻¹	1.0 µl	2 pmol.µl ⁻¹
DNA	25 ng.µl ⁻¹	1.0 µl	1ng.µL
dNTP	10 mMol	0.50 µl	0.2 mM
TaqDNApol.	5 U.µl ⁻¹	0.20µl	0.04 U. µl ⁻¹
Total		25 µl	

TABELA 3.20:

Mistura de reacção utilizada em RAPD com o “primer” 1281 e com o “primer” 1290

	Soluções stock	Mistura da reacção	
	Concentração	Volume reagentes	Concent.
Água u.p.		13.8 µl	-
Tampão	10X	2.5 µl	1X
MgCl ₂	50 mM	1.5 µl	2.5 mM
“primer”	50 pmol.µl ⁻¹	0.5 µl + 0.5 µl	2 pmol.µl ⁻¹
DNA	25 ng.µl ⁻¹	5.0 µl	1ng.µl ⁻¹
dNTP	10 mMol	1.0 µl	0.2 mM
TaqDNApol.	5 U.µl ⁻¹	0.2 µl	0.04 U. µl ⁻¹
Total		25 µl	

TABELA 3.21:

Mistura de reacção utilizada em Rep-PCR com os “primers” REPI/REPII.

	Soluções stock	Mistura da reacção	
	Concentração	Volume reagentes	Concent.
Água u.p.		18.55 µl	-
Tampão	10X	2.5 µl	1X
MgCl ₂	50 mM	1.25 µl	2.5 mM
“Primer”	50 pmol.µl ⁻¹	1 µl	2 pmol.µl ⁻¹
DNA	25 ng.µl ⁻¹	5 µl	1 ng.µl ⁻¹
dNTP	10 mMol	1.0 µl	0.2 mM
TaqDNApol.	5 U.µl ⁻¹	1 UI	0.04 U. µl ⁻¹
Total		25 µl	

TABELA 3.22:
Mistura de reacção utilizada em M13-PCR.

O processo de amplificação foi realizado no aparelho “Thermocycler 9600 Gradient” da Stratagene. Este processo ocorreu nas condições e de acordo com os programas dos respectivos “primers” conforme mostra a TABELA 3.23.

Como se pode observar nesta tabela, na tentativa de aproximar as condições de execução das quatro experiências de “PCR fingerprinting”, procurou-se utilizar uma temperatura de “annealing” igual (36°C), enquanto que nos restantes parâmetros do processo é de sublinhar apenas a diferença entre os 40 ciclos para os “primers” de RAPD contra os 30 de Rep-PCR e M13-PCR.

	Ciclos	RAPD"		Ciclos	REP/M13-PCR	
		1281	1290		M13	REPI/REPII
Desnaturação inicial	1	94° C/3 min		1	95° C/7 min	
Desnaturação	40	94° C /1 min		30	95° C /1 min	
"annealing"		36° C /2 min			36° C /1 min	
Extensão		72° C /2 min			72° C /2 min	
Extensão final	1	72° C /5 min		1	72° C /16 min	

TABELA 3.23:
Programas de amplificação utilizados em RAPD, Rep-PCR e M13-PCR.

3.2.3. Observação dos perfis por electroforese em gel de agarose

Os fragmentos resultantes das reacções de PCR foram separados em géis de agarose a 1,2% (TBE 0,5X) nos quais foram aplicados 5 µl da reacção. A electroforese decorreu durante 4 horas, a 90 V e em TBE 0,5X. Depois, o gel foi corado com brometo de etídio e a imagem recolhida e digitalizada com o programa KODAK 1D 2.0.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a análise dos resultados, o procedimento utilizado para o tratamento dos dados foi o mesmo para todas as técnicas incluídas na abordagem de “PCR-fingerprinting”. Assim sendo, após a amplificação dos DNAs e o subsequente processo de electroforese, as imagens digitalizadas dos géis foram analisadas recorrendo ao software BioNumerics (Applied Maths).

Com este software, e para comparação isolada e conjunta dos “fingerprints” obtidos para cada isolado e avaliação subsequente da diversidade, construíram-se dendrogramas dos conjuntos de isolados de *C. jejuni* e de *C. coli*, baseando-se na comparação dos perfis densitométricos respectivos e utilizando o coeficiente de correlação de Pearson e o método de aglomeração baseado na distância média não ponderada (UPGMA).

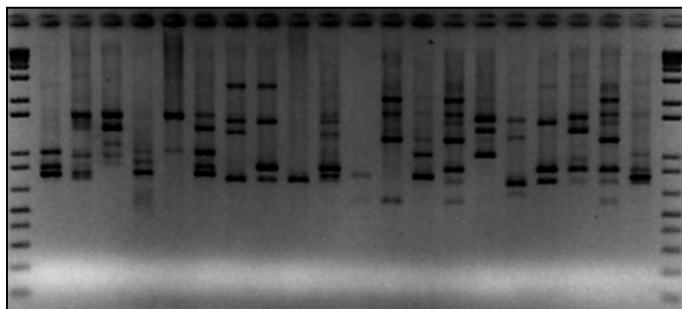
3.3.1. Análise dos perfis

1. Técnica de RAPD

Atendendo aos objectivos desta dissertação, vários “primers” foram testados e, de acordo com critérios de selecção que envolveram o número, intensidade e reprodutibilidade das bandas nos diferentes perfis obtidos (dados não apresentados), foram seleccionados os primers 1281 e 1290, aplicados por Akopyanz *et al.* (1992b) na tipificação de *Helicobacter pylori*.

Na FIGURA 3.8 exemplificam-se os perfis de bandas obtidos com a técnica de RAPD, utilizando os “primers” 1281 (A) e 1290(B).

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 M

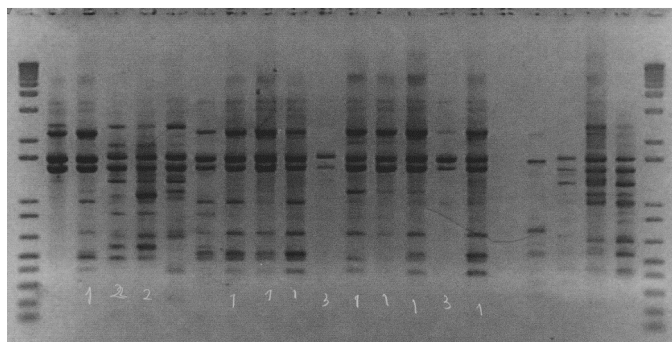


M: marcador molecular 1kb DNAladder (Gibco); 1 a 18: S02, S04, S05, S10, S20, S21, S22, S30, S32, S33, S36, S37, S38, S39, S40, S41, S45.

FIGURA 3.8:
Perfis de RAPD de alguns isolados de *C. jejuni* e *C. coli*, utilizando os “primers” 1281 e 1290.

A: “primer” 1281

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 M



M: marcador molecular 1kb DNAladder (Gibco); 1 a 19: S78, S79, S80, S81, S82, S84, S85, S86, S91, S93, S99, S118, S119, S120, 37A, 38A, 41A, 45A.

B: “primer” 1290

Na amplificação dos seus DNAs por RAPD, todos os isolados analisados neste “screening”, dos quais 101 de *C. jejuni* e 86 de *C. coli*, geraram perfis de bandas, excepto um, identificado como pertencente a espécie de *C. jejuni*, que por ter falhado a amplificação na utilização do “primer” 1290 foi excluído desta análise.

Com os resultados obtidos, foi possível verificar o elevado poder de tipificação desta técnica que se traduz pelas taxas de tipificação de 99 e 100%, obtidas para os “primers” 1281 e 1290, respectivamente. Estes resultados corroboram os que têm sido apresentados nos diversos trabalhos em que este método é utilizado, demonstrando assim a potencialidade da técnica em relação aos métodos fenotípicos (Hilton *et al.*, 1997; Ono *et al.*, 2003).

Para avaliar o potencial taxonómico foram construídos dendrogramas com os “primers” 1281 e 1290, contendo todos os isolados de *C. jejuni* e *C. coli* (dados não apresentados), e da sua análise constatou-se não haver possibilidade de estabelecer relações taxonómicas entre as estirpes a nível de espécie, uma vez que se detectou que estirpes de espécies diferentes apresentavam níveis de semelhança relativamente elevados entre si, sendo por isso incluídas no mesmo sub-grupo (“cluster”).

Por outro lado, verificou-se também que as estirpes pertencentes à mesma espécie se distribuíam ao longo do dendrograma, em níveis de semelhança variáveis, sendo muitos deles bastantes reduzidos e impossibilitando assim a definição de “clusters” ao nível de espécie.

Uma explicação plausível para esta situação é o facto dos “primers” utilizados hibridarem com regiões do DNA conservadas a nível de género, impedindo a clara separação das duas espécies em análise. Por outro lado, as baixas condições de restrição no “annealing” podem conduzir também a amplificações de regiões genómicas que, embora distintas em termos de sequência em cada espécie, podem apresentar amplicões de igual dimensão conduzindo ao agrupamento de estirpes das duas espécies.

No entanto, para cada “primer” utilizado foram obtidos perfis de amplificação que, evidenciando os polimorfismos existentes, permitem estabelecer o relacionamento ou o afastamento das estirpes de cada espécie em estudo.

Não foi igualmente possível estabelecer uma correlação entre as estirpes e a sua origem, pois constatou-se que estirpes de origem e de espécies diferentes conseguem ter níveis de semelhança tão elevados como outras pertencentes à mesma espécie mas de origem diferente.

Assim, perante a impossibilidade demonstrada para o agrupamento taxonómico dos isolados em estudo, a abordagem de “PCR-fingerprinting” foi utilizada apenas para tipificação dos mesmos e avaliação da diversidade a nível de cada espécie. Deste modo, todas as análises de “PCR-fingerprinting” apresentadas a seguir baseiam-se em dendrogramas construídos separadamente para *C. jejuni* e *C. coli*.

Tendo em conta a reprodutibilidade global dos sistemas de “PCR-fingerprinting” (ver ponto 3.3.2), e para uma análise comparativa das diferentes técnicas usadas, definiu-se o nível de semelhança de 80% como linha de corte arbitrária para a definição de tipos, em cada espécie e em cada técnica.

Nas FIGURAS 3.9 a 3.12 apresentam-se os dendrogramas baseados nos perfis densitométricos de RAPD com os “primers” 1281 e 1290, para os isolados de *C. jejuni* e *C. coli*.

Para as estirpes de *C. jejuni* (FIGURA 3.9), a utilização do “primer” 1281 permitiu distinguir 53 tipos entre os 101 isolados analisados, sendo vários deles representados por um número muito reduzido de isolados, entre 1 e 4. No entanto, registaram-se alguns tipos mais frequentes, sendo o mais abundante representado por 11 isolados. Em relação a *C. coli* (FIGURA 3.10), as 86 estirpes analisadas distribuíram-se por 44 tipos distintos que, na maioria, são formados por apenas um ou dois isolados. Os dois perfis dominantes englobam 16 e 8 isolados, respectivamente.

Analisando os dendrogramas das FIGURAS 3.11 e 3.12, referentes ao “primer” 1290, as relações de semelhança obtidas permitiram detectar 84 tipos em 100 isolados de *C. jejuni* e 64 tipos nos 86 isolados de *C. coli*. Neste caso, a média de distribuição dos isolados por tipo é baixa em ambas as espécies analisadas (inferior a 2). No entanto, há alguns tipos mais representados, com 5 ou 4 isolados. A presença de maior número e diversidade de bandas nos perfis produzidos com o “primer” 1290, relativamente ao “primer” 1281 e particularmente em *C. jejuni*, é responsável pelo seu maior poder discriminante.

A congruência das associações entre os isolados reveladas pela técnica de RAPD com estes dois “primers”, avaliada pelo coeficiente de correlação entre as matrizes de semelhança respectivas, é de 15,1% para *C. jejuni* e 30,3% para *C. coli*. Estes baixos valores conduzem a que as inferências sobre a semelhança genómica estimada por RAPD entre dois isolados particulares seja, na maior parte dos casos, distinta com ambos os “primers”. Por outro lado, a maior variabilidade genómica de *C. jejuni*, já anteriormente detectada e discutida, é mais uma vez evidenciada pelo maior número de tipos e pela menor congruência entre “primers”.

Em termos de comparação entre tipos RAPD e biotipos, e entre tipos RAPD e origem geográfica das amostras, não foi encontrada nenhuma associação relevante.

Em *C. jejuni*, os poucos isolados dos biotipos II e III aparecem dispersos ao longo do dendrograma, tal como os 5 isolados de Angola. Em *C. coli*, observa-se um padrão análogo para os poucos isolados do biotipo II. Relativamente aos 24 isolados de Portugal, e com ambos os “primers”, observa-se alguma tendência de agrupamento destes isolados, mas os grupos formados diferem consoante o “primer”. Em alguns tipos incluem-se isolados de ambas as origens geográficas.

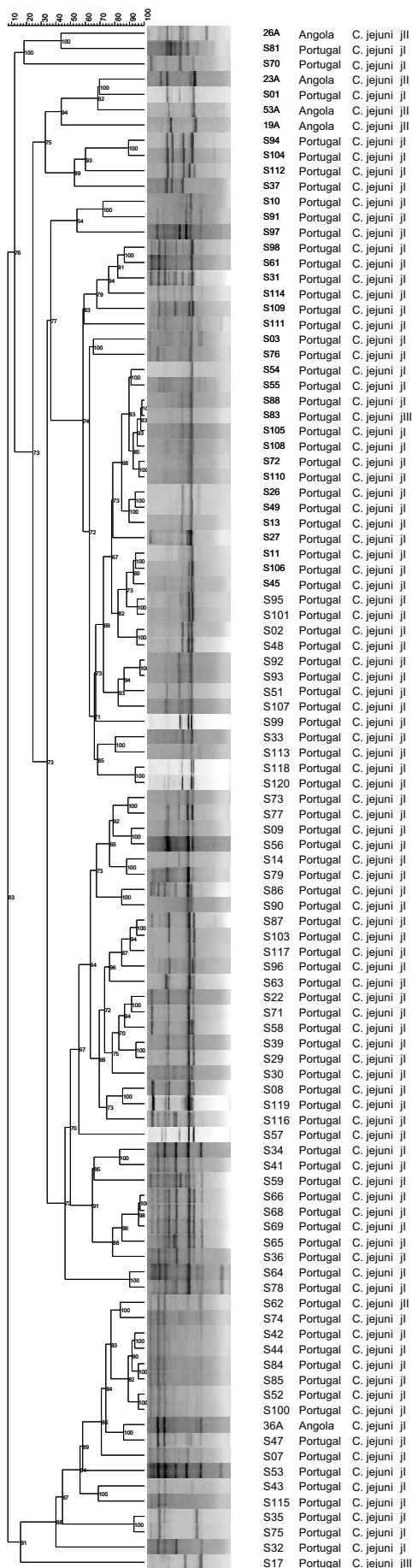


FIGURA 3.9: Dendrograma construído com base nos perfis densitométricos de *C. jejuni* com o primer 1281, utilizando o coeficiente de correlação de Pearson e o método de aglomeração UPGMA.

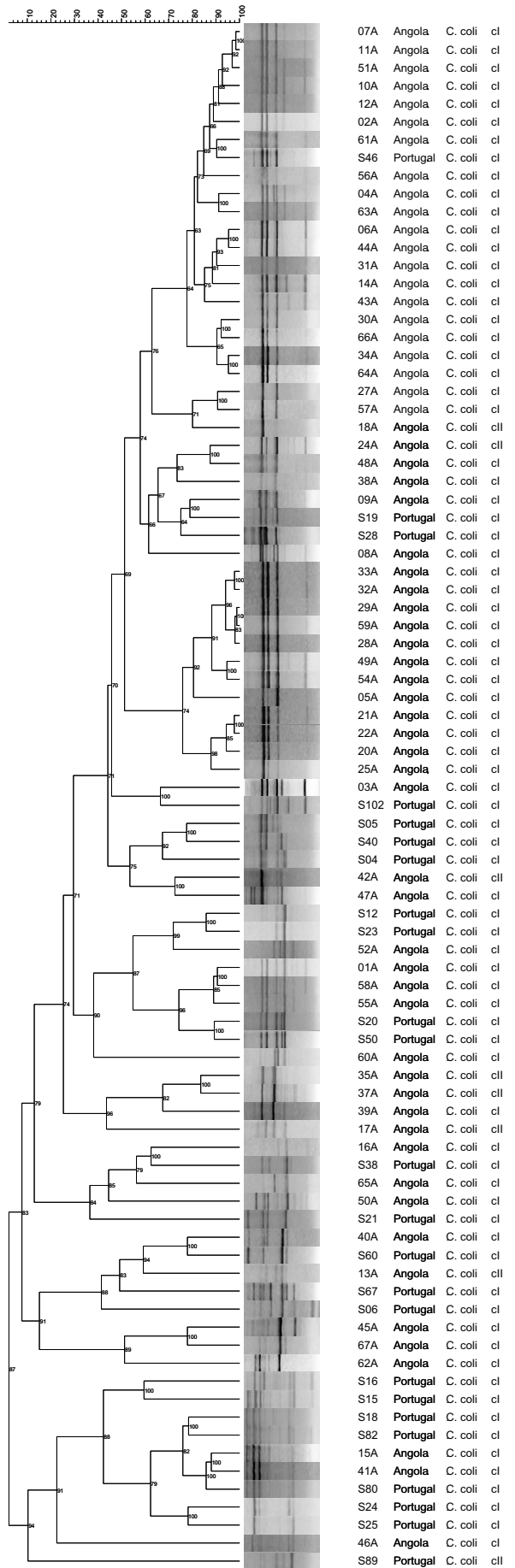


FIGURA 3.10: Dendrograma construído com base nos perfis densitométricos de *C. coli* com o primer 1281, utilizando o coeficiente de correlação de Pearson e o método de aglomeração UPGMA.

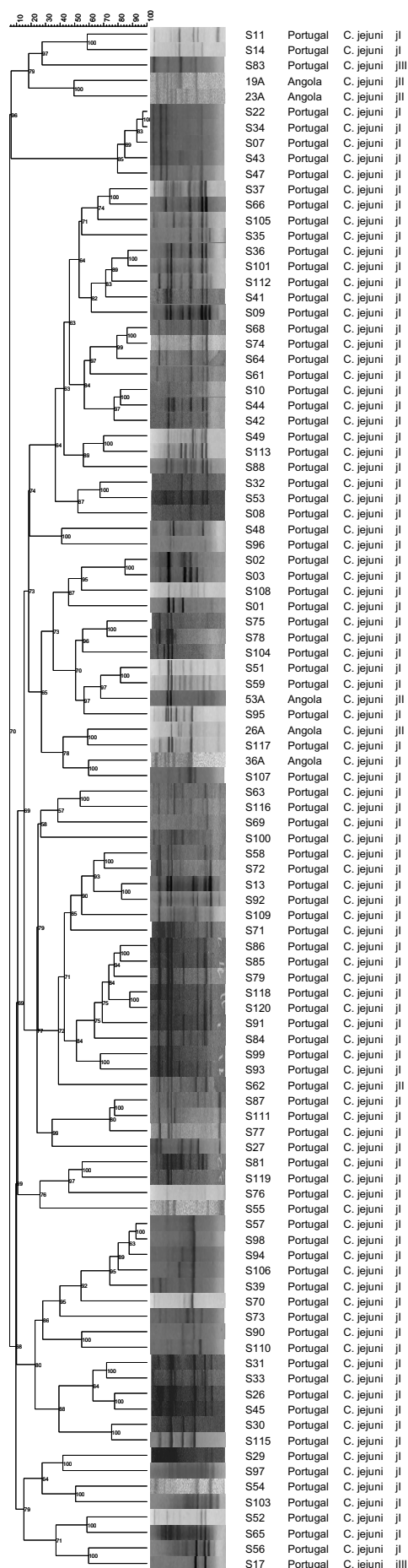


FIGURA 3.11: Dendrograma construído com base nos perfis densitométricos de *C. jejuni* com o primer 1290, utilizando o coeficiente de correlação de Pearson e o método de aglomeração UPGMA.

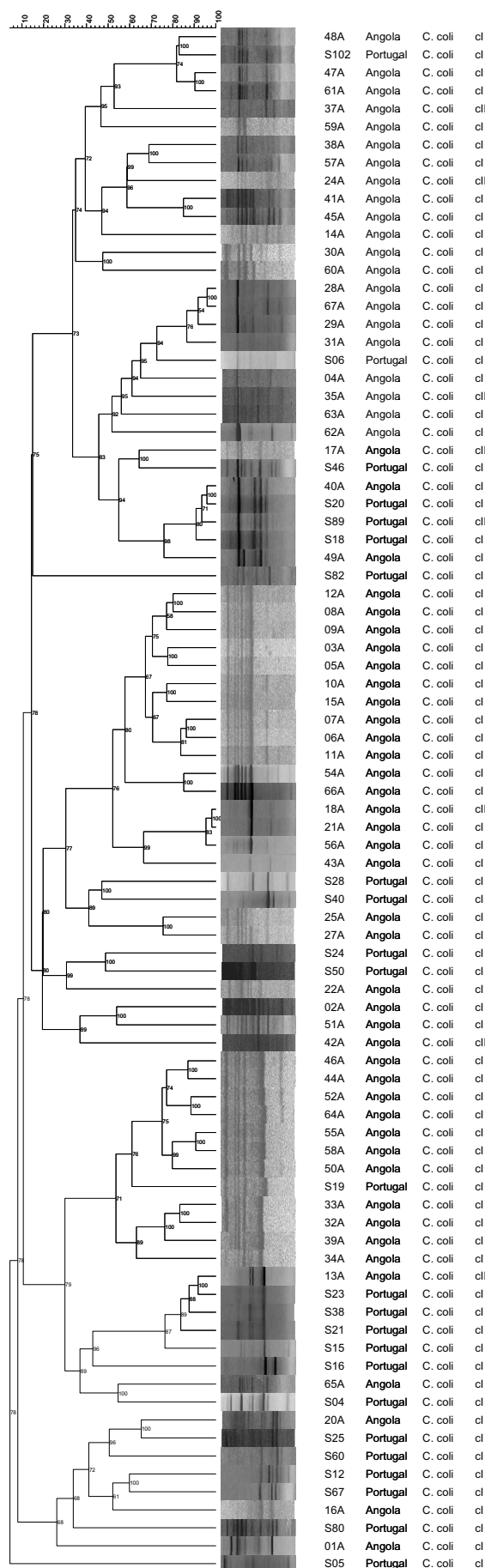


FIGURA 3.12: Dendrograma construído com base nos perfis densitométricos de *C. coli* com o primer 1290, utilizando o coeficiente de correlação de Pearson e o método de aglomeração UPGMA.

2. Técnica de Rep-PCR

Com esta técnica, a amplificação foi realizada usando simultaneamente os “primers” REPI e REPII que são particularmente dirigidos às sequências genómicas repetidas designadas por REP ou “Repetitive Extragenic Palindrome”, a fim de se obterem perfis de “fingerprinting” capazes de distinguir os isolados e avaliar as suas relações de afinidade genómica global.

Na FIGURA 3.13 ilustram-se os perfis de amplificação obtidos por Rep-PCR para alguns dos isolados de *C. jejuni* e *C. coli* em estudo. Todos os isolados submetidos a este “screening” (101 de *C. jejuni* e 86 de *C. coli*) apresentaram amplificações interpretáveis, revelando-se deste modo um poder de tipificação máximo desta técnica para os isolados de *Campylobacter* spp. em estudo.

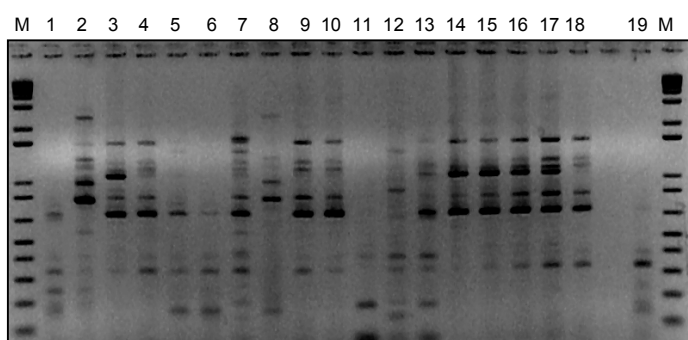


FIGURA 3.13

Perfis de Rep-PCR de alguns isolados de *C. jejuni* e *C. coli*, utilizando os “primers” REPI/ REPII.

M: marcador molecular 1kb DNA ladder (Gibco); 1 a 19: 39A, 61A, 58A, 45A, 42A, S43, S82, S63, S28, 64A, S89, 46A, 44A, 44Ad, 59A, 34A, 32A

Com os perfis densitométricos obtidos na aplicação da técnica de Rep-PCR, construíram-se dois dendrogramas, um para *C. jejuni* (FIGURA 3.14) e outro para *C. coli* (FIGURA 3.15), tendo sido aplicada a linha de corte arbitrária de 80% de semelhança para a definição de tipos, tal como descrito anteriormente.

Para *C. jejuni* definiram-se 44 tipos, a maioria dos quais contendo 1 a 3 isolados, embora em alguns tipos este número tenha sido mais elevado atingindo o número de 16 isolados no mais abundante. Em relação a *C. coli* o número de tipos foi de 42, predominando os tipos com 1 ou 2 isolados e apresentando os dois tipos mais frequentes 7 e 15 isolados, respectivamente.

A congruência dos agrupamentos formados pelas técnicas de Rep-PCR e RAPD foi bastante reduzida ($\leq 20\%$ para *C. jejuni* e $\approx 30\%$ para *C. coli*), evidenciando por um lado os distintos alvos genómicos abrangidos e, por outro, mais uma vez a maior variabilidade de *C. jejuni*.

De modo análogo à análise de RAPD, não se verificou nenhuma associação entre tipos REP e biotipos ou origem geográfica dos isolados. De facto, e tal com observado com RAPD, vários tipos de *C. coli* incluem isolados de Angola e Portugal.

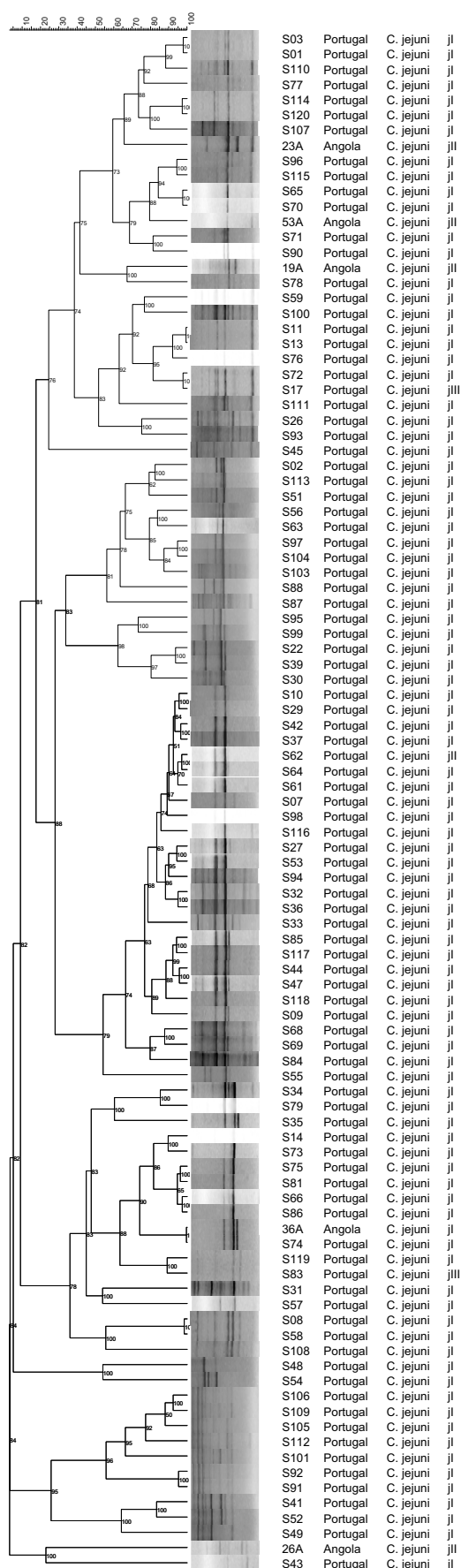


FIGURA 3.14: Dendrograma construído com os perfis de *C. jejuni*, utilizando os "primers" REPIR e REPIR, o coeficiente de correlação de Pearson e o método de aglomeração UPGMA.

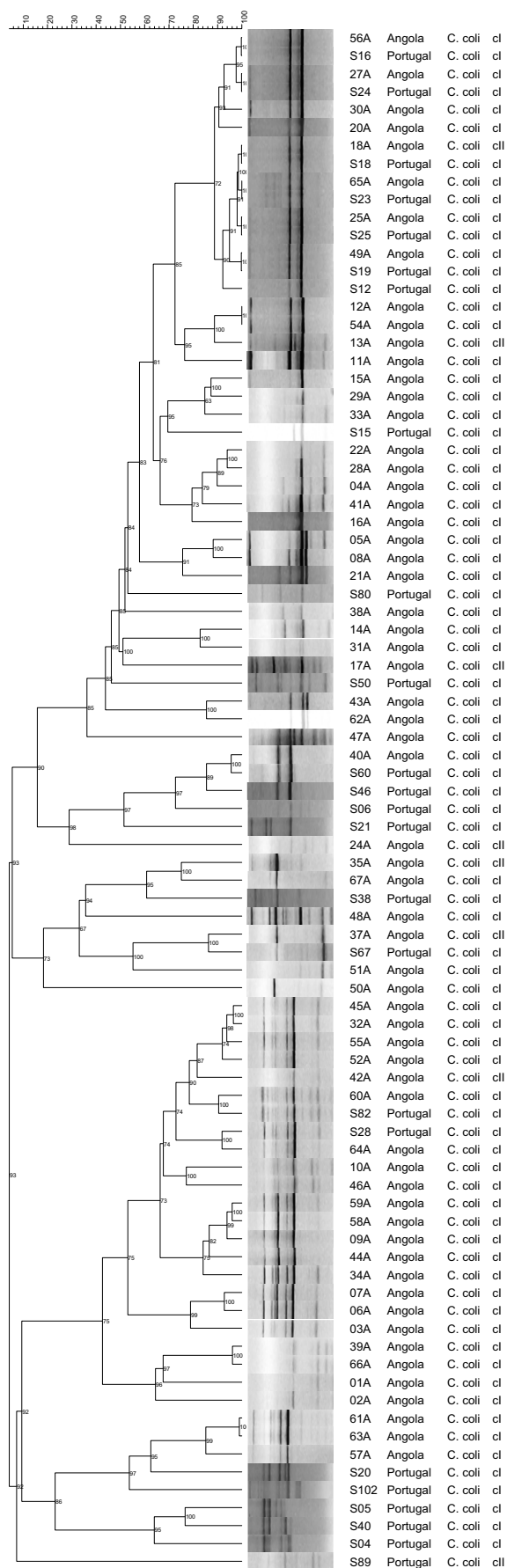


FIGURA 3.15: Dendrograma construído com os perfis de *C. coli*, utilizando os "primers" REPIR e REPIR, o coeficiente de correlação de Pearson e o método de aglomeração UPGMA.

3. Técnica de M13-PCR

De igual modo como nos casos anteriores relacionados com a análise de PCR-fingerprinting, os perfis densitométricos obtidos com o “primer” M13 foram utilizados para construir dois dendrogramas, sendo um para cada espécie.

A FIGURA 3.16 exemplifica os perfis de amplificação obtidos por M13-PCR para alguns isolados de *C. jejuni* e *C. coli*. Tal como com a técnica de Rep-PCR, observou-se uma capacidade de tipificação de 100% nas duas espécies em análise.

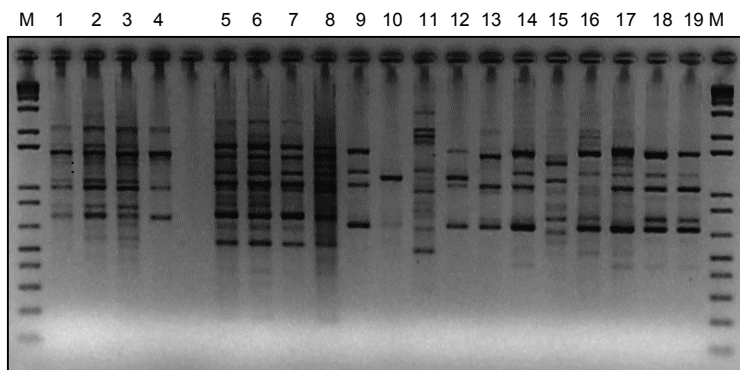


FIGURA 3.16:
Perfis de M13-PCR de alguns isolados de *C. jejuni* e *C. coli*, utilizando o “primer” M13

M: marcador molecular 1kb DNA ladder (Gibco); 1 a 19: S67, S68, S69, S71, S96, S108, S115, S111, A56, A19, A20, A21, A22, A23, A40, A51, A48, A46.

Utilizando o nível de semelhança de 80%, e com base nos dendrogramas das FIGURAS 3.17 e 3.18, foram definidos 39 e 38 tipos para *C. jejuni* e *C. coli*, respectivamente. Em comparação com os resultados de tipificação obtidos com RAPD (com os “primers” 1281 e 1290) e Rep-PCR, verifica-se que a técnica de M13-PCR é que menos tipos produziu, tendo apresentado uma média de pelo menos 3 e 2 isolados para *C. jejuni* e *C. coli*, respectivamente, por agrupamento formado.

Ainda que também não tenha sido possível obter uma associação relevante entre tipos M13 e biotipos ou origem geográfica dos isolados, apenas com a técnica de M13-PCR foi possível agrupar os dois isolados de *C. jejuni* do biotipo III (embora num tipo M13 contendo também dois isolados do biotipo I), e observar um agrupamento parcial dos isolados de *C. coli* provenientes de Portugal, que formam alguns sub-clusters de tipos M13 não incluindo isolados de Angola (v.g, grupo S20-S38 e S18-S05 na FIGURA 3.18).

3.3.2. Avaliação do potencial de diferenciação

Para avaliação do potencial de diferenciação dos métodos de “PCR-fingerprinting” usados neste trabalho, além dos dendrogramas obtidos isoladamente com cada técnica, construiu-se um dendrograma conjunto para *C. jejuni* (FIGURA 3.19) e outro para *C. coli* (FIGURA 3.20). cada um deles integrando, numa abordagem polifásica simultânea, a análise dos perfis de “fingerprinting” obtidos com RAPD (com os “primers” 1281 e 1290), Rep-PCR (com os “primers REPI/REPII) e M13-PCR (com o “primer” csM13).

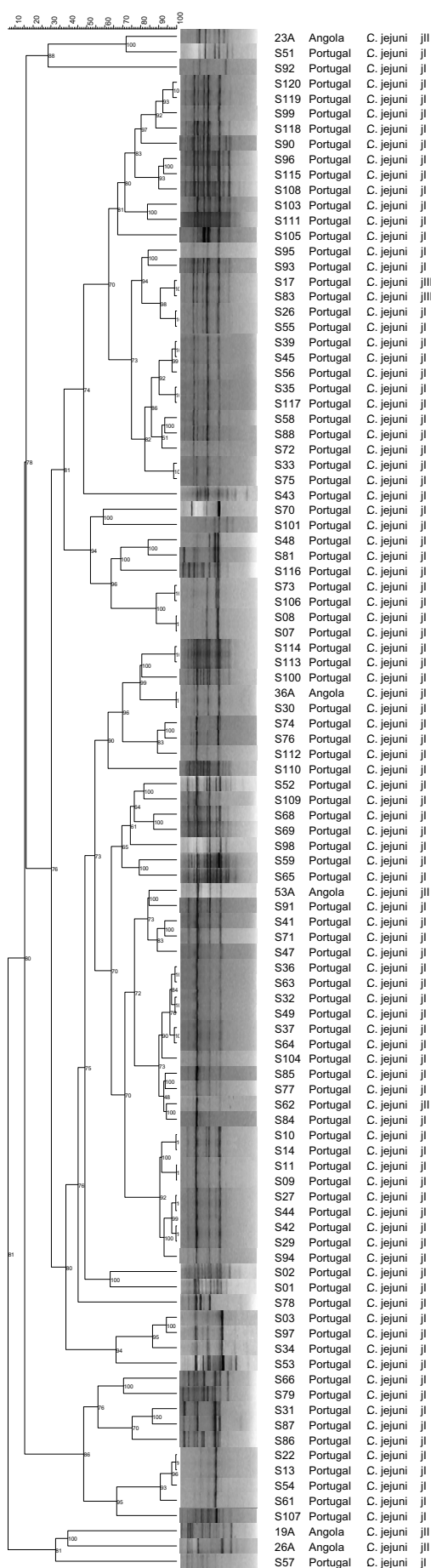


FIGURA 3.17: Dendrograma construído com base nos perfis densitométricos de *C. jejuni* com o primer M13, utilizando o coeficiente de correlação de Pearson e o método de aglomeração UPGMA.

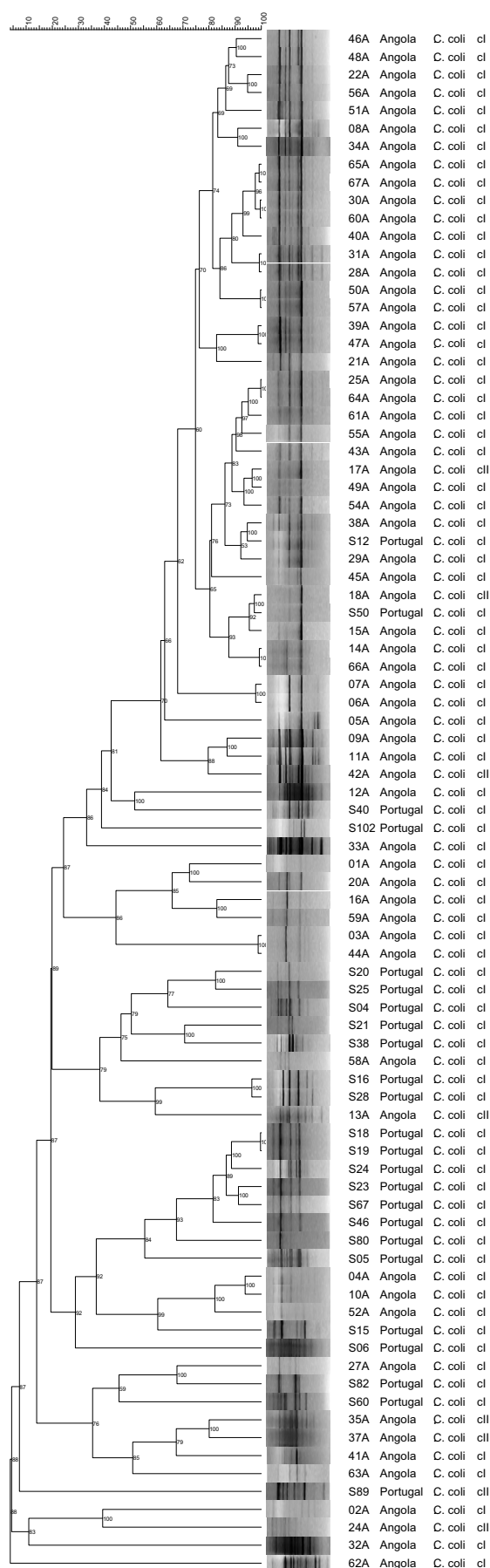


FIGURA 3.18: Dendrograma construído com base nos perfis densitométricos de *C. coli*, com o primer M13, utilizando o coeficiente de correlação de Pearson e o método de aglomeração UPGMA.

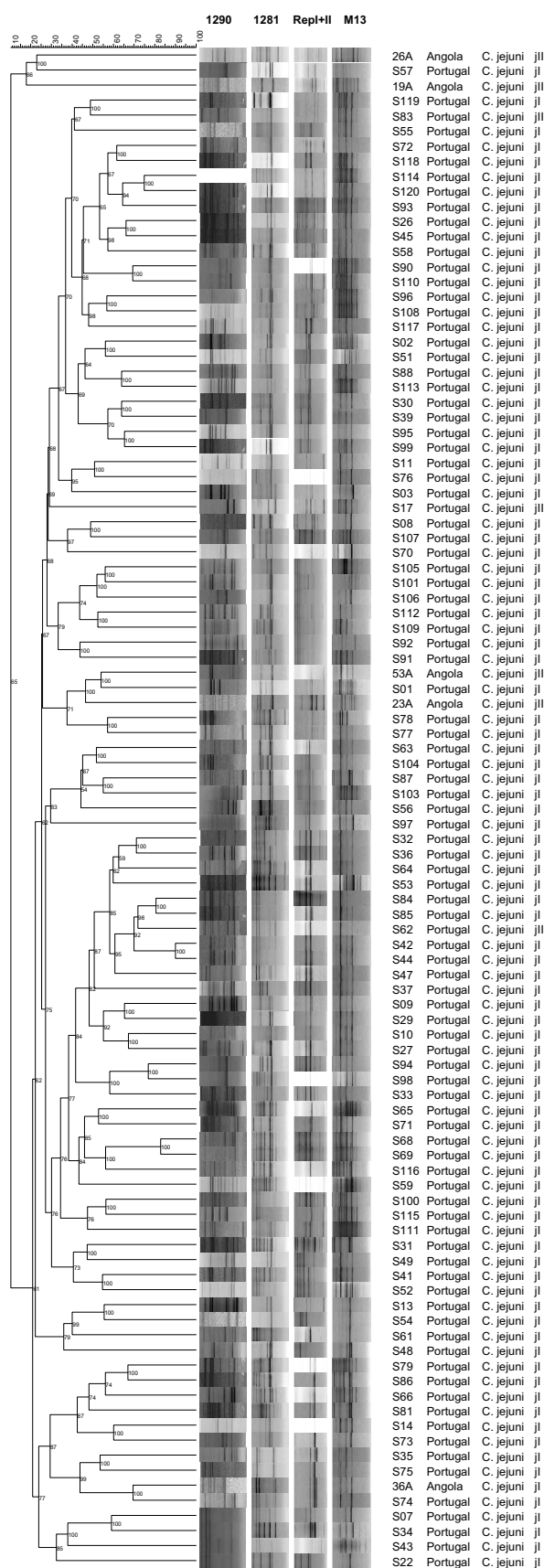


FIGURA 3.19: Dendrograma construído com base nos perfis densitométricos de *C. jejuni* obtidos numa análise global de “fingerprinting”, utilizando o coeficiente de correlação de Pearson e o método de aglomeração UPGMA.

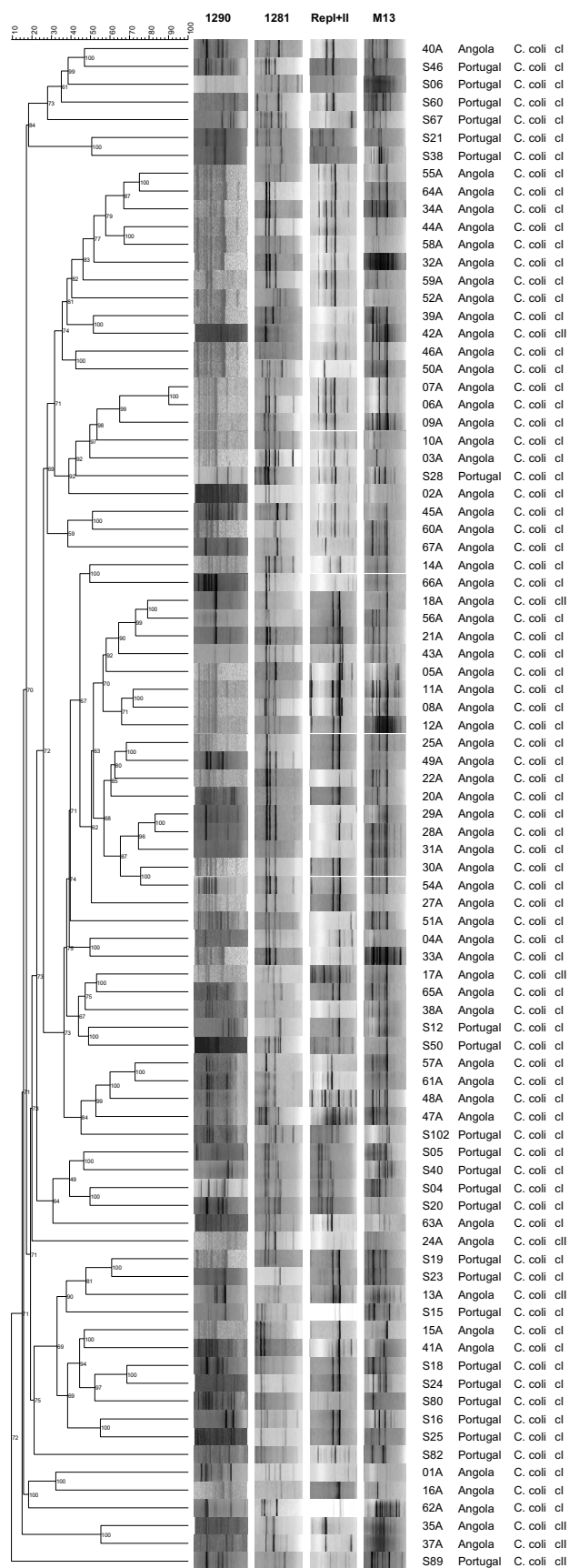


FIGURA 3.20: Dendrograma construído com base nos perfis densitométricos de *C. coli* obtidos numa análise global de “fingerprinting”, utilizando o coeficiente de correlação de Pearson e o método de aglomeração UPGMA.

Analisando os dendrogramas das FIGURAS 3.19 e 3.20, torna-se evidente o maior potencial da abordagem polifásica integrando os resultados das diferentes técnicas de “PCR-fingerprinting”. De facto, e utilizando o nível arbitrário de corte a 80% de semelhança, foi possível definir 98 tipos para *C. jejuni* e 83 tipos para *C. coli*. Este número elevado de tipos resulta do diferente agrupamento de isolados produzido por cada método individualmente pois, apesar de todos detectarem polimorfismos a nível global do genoma, os princípios subjacentes a cada um são bastante diferentes, permitindo detectar distintas variações genéticas. Resultados análogos na utilização conjunta de diversos métodos de tipificação em *Campylobacter* spp., apenas genotípicos ou em associação com métodos fenotípicos, foram igualmente descritos por outros autores (Nielsen *et al.*, 2000; Wassenaar & Newell, 2000; Mouwen *et al.*, 2005).

A congruência das associações de isolados observada entre a abordagem global (RAPD-REP-M13) e cada um dos métodos situou-se nos intervalos 51,4-57,4% e 53,6-57,7% para *C. jejuni* e *C. coli*, respectivamente, evidenciando também o “poder-tampão” da utilização de um maior número de caracteres na análise conjunta.

Também nos dendrogramas globais não se observou uma associação das estirpes pertencentes aos biotipos minoritários, mostrando assim a pouca relevância das características fenotípicas usadas nesta biotipagem.

Relativamente à origem geográfica dos isolados, a análise global dos perfis de “PCR-fingerprinting” evidenciou um algum nível de associação dos isolados de *C. coli* provenientes de Portugal, com 79% destes isolados agrupados em 3 sub-clusters principais: (i) sub-cluster 40A-S38, contendo 6 isolados de Portugal e 1 de Angola; (ii) sub-cluster S05-63A, contendo 4 isolados de Portugal e 1 de Angola; e (iii) sub-cluster S19-S82, contendo 9 isolados de Portugal e 3 de Angola.

1. Reprodutibilidade das técnicas

Tal como se procedeu para as técnicas de ITS-ARDRA e RFLP-*flaA*, a análise da reprodutibilidade foi efectuada seleccionando aleatoriamente 10% dos isolados em estudo (19 de 187), que foram separadamente manipulados em duplicados. A reprodutibilidade foi estimada globalmente (para as 4 técnicas de “PCR-fingerprinting”) como a média aritmética das percentagens de semelhança (coeficiente de correlação Pearson) das réplicas com os isolados originais correspondentes.

O valor médio de reprodutibilidade foi assim estimado em 92% (mínimo: 81,4%; máximo: 99,5%; mediana: 96%), tendo associado um coeficiente de variação de 7,4%. Esta reprodutibilidade revelou-se francamente superior à obtida na análise de polimorfismos de restrição e garante a fiabilidade dos perfis obtidos, sobretudo tendo em conta a baixa temperatura de “annealing” (36°C) usada nas várias técnicas de “PCR-fingerprinting”.

2. Índices de diversidade

A partir dos dendrogramas apresentados nas FIGURAS 3.9 a 3.12, 3.14, 3.15 e 3.17 a 3.20, e utilizando igualmente o nível de corte arbitrário a 80% de semelhança, determinaram-se os correspondentes índices de diversidade de Simpson e de Shannon-Wiener, de forma a avaliar quantitativamente o poder discriminante, quer associado isoladamente a cada uma das técnicas de “PCR-fingerprinting” (RAPD com cada um dos “primers” 1281 e 1290, Rep-PCR e M13-PCR), quer associado à abordagem polifásica integrando os resultados das quatro técnicas (“Fingerprinting” global).

Nas TABELAS 3.24 e 3.25 apresentam-se os valores destes índices de diversidade obtidos para *C. jejuni* e *C. coli*, respectivamente.

	N	s	max nj	D	J'
RAPD (p1281)	101	53	11	0,973	0,925
RAPD (p1290)	100	84	5	0,995	0,979
REP-PCR	101	44	16	0,959	0,901
M13-PCR	101	39	11	0,959	0,899
“Fingerprinting” global	101	98	2	0,999	0,998

TABELA: 3.24:

Valores dos índices de diversidade obtidos em todos os ensaios de “PCR-fingerprinting” em relação a *C. jejuni*.

N: número de isolados; s: número de tipos; max nj: frequência máxima encontrada no conjunto dos tipos.

	N	s	max nj	D	J'
RAPD (p1281)	86	44	16	0,952	0,891
RAPD (p1290)	86	62	4	0,989	0,963
REP-PCR	86	42	15	0,954	0,896
M13-PCR	86	38	17	0,922	0,836
“Fingerprinting” global	86	83	2	0,999	0,997

TABELA: 3.25.

Valores dos índices de diversidade obtidos em todos os ensaios de “PCR-fingerprinting” em relação a *C. coli*.

N: número de isolados; s: número de tipos; max nj: frequência máxima encontrada no conjunto dos tipos.

Analisando as TABELAS 3.24 e 3.25, e tal como se esperava tendo em conta o número de tipos descritos no ponto 3.3.1, constata-se que os valores obtidos para os índices de diversidade, quer de Simpson (D), quer de Shannon-Wiener (J'), foram bastante elevados, variando globalmente entre 0,836 e 0,979, e confirmando assim o elevado poder discriminante dos quatro métodos de “PCR-fingerprinting” aplicados aos isolados de *C. jejuni* e *C. coli*. Por seu lado, a combinação polifásica dos resultados destes métodos (“Fingerprinting” global) apresentou, para ambas as espécies, valores ainda superiores de poder discriminante (entre 0,997 e 0,998).

Em ambas as espécies, o método de RAPD (pelo menos para um dos “primers”) evidenciou uma maior variabilidade genómica dos isolados relativamente aos métodos direccionados para sequências repetidas do genoma (Rep-PCR e M13-PCR), enquanto que o método de M13-PCR revelou ser o menos discriminante de todos.

Diversos trabalhos anteriores demonstraram que o método de RAPD constitui uma mais valia e um instrumento com elevado poder discriminativo nas estirpes de *Campylobacter* spp., quer *per se*, quer comparativamente a outros métodos de tipificação (Hernandez *et al.*, 1995; Hanninen *et al.*, 1998; Nielsen *et al.*, 2000; Ono *et al.* 2003; Scates *et al.*, 2003; Tu *et al.*, 2005; Açik *et al.*, 2006).

Em termos de valores disponíveis de índices de diversidade, Hernandez *et al.* (1995) e Hilton *et al.* (1997) encontraram valores de $D = 0,999$ e $D = 0,990$, respectivamente, na análise de isolados de origem diversa (ambiental, alimentar e humana). Um valor de D igualmente elevado (0,984) para RAPD foi obtido por Nielsen *et al.* (2000), na análise de 80 isolados de *C. jejuni* sem relação epidemiológica conhecida, enquanto que um valor bastante inferior ($D = 0,698$) foi ainda descrito por Mouwen *et al.* (2005), num conjunto de 17 isolados de *C. jejuni* e *C. coli*, analisados por ERIC-PCR (um método igualmente dirigido para sequências repetidas).

No entanto, Ertas *et al.* (2004) obtiveram apenas 5 tipos na aplicação da técnica de RAPD numa análise de 57 isolados de *C. jejuni* e 45 de *C. coli*, enquanto que por RFLP-*flaA* foram identificados 7 tipos distintos, demonstrando que a técnica de RFLP-*flaA* pode ser mais discriminante que a análise por RAPD e justificando a aplicação e comparação de diferentes métodos de tipificação para isolados destas espécies.

Deste modo, e como demonstram os resultados obtidos nesta dissertação e os referidos por diversos autores para *Campylobacter* spp. (Wassenaar & Newell, 2000; Mouwen *et al.*, 2005; Wittwer *et al.*, 2005), a utilização de uma abordagem polifásica, integrando os resultados de métodos direccionados para alvos distintos no genoma, revela-se mais eficiente na tipificação e avaliação da diversidade genómica. Tendo em conta que as taxas de evolução podem variar entre regiões genómicas e como resposta pressões selectivas, a “verdadeira” via evolutiva de um organismo não pode ser respondida por um único sistema de tipificação, visto que cada método realça um aspecto particular, sobretudo em populações com fraca estrutura clonal (panmícticas) como as de *Campylobacter* spp.

Considerando as relações genómicas estabelecidas por “PCR-fingerprinting”, pesquisou-se igualmente a existência de associações entre tipos genómicos e perfis de resistência a antibióticos (Capítulo 2 da Parte II) dos isolados de *C. jejuni* e *C. coli*. Em geral, as resistências aos 7 antibióticos avaliados aparecem dispersas por todo o dendrograma em ambas as espécies e o mesmo perfil de resistência/sensibilidade pode ser encontrado em vários tipos genómicos, tanto em *C. jejuni* como em *C. coli*.

Em *C. jejuni*, para os três tipos genómicos incluindo 2 isolados, foi possível observar um caso de identidade nos perfis de resistência (isolados S68 e S69), não havendo informação disponível acerca da resistência dos isolados S42 e S44. Em *C. coli*, os 3 tipos com dois isolados mostraram distintos perfis de resistência: (i) no tipo 07A-06A, o isolado 06A é resistente ao ácido nalidíxico e à ciprofloxacina e o isolado 07A é sensível; (ii) no tipo 18A-56A, o isolado 18A é sensível à claritromicina e 56A é de resistência intermédia; e (iii) no tipo 29A-28A, o isolado 29A é resistente ao ácido nalidíxico e com resistência intermédia à eritromicina e ampicilina, enquanto 28A é sensível a estes três antibióticos.

Ainda que os dois únicos isolados multiresistentes, *C. coli* 22A (resistentes aos 7 antibióticos testados) e *C. jejuni* S93 (sensível apenas a ciprofloxacina), e 6 dos 8 isolados de *C. coli* sensíveis a todos os antibióticos testados apresentem tipos genómicos únicos, aparecem associados em sub-clusters com outros tipos genómicos, com os quais partilham semelhanças relativamente elevadas (60-75%). De facto, um exemplo objectivo da falta de associação entre relações genómicas e perfis de resistência é constituído pelos isolados 25A (sensível aos 7 antibióticos) e 22A (resistente aos 7 antibióticos) de *C. coli*, que pertencem ao sub-cluster 25A-20A definido a cerca de 60% de semelhança.

Esta ausência de associação entre perfis genómicos (determinados com outros métodos moleculares) e perfis de resistência a antibióticos, em *C. jejuni* e *C. coli*, foi já descrita para populações destas espécies e de origens diferentes. De facto, em isolados de frangos e humanos no Senegal, Cardinale *et al.* (2006) não encontraram qualquer relação entre os perfis de macrorestrição com *Sma*I e *Kpn*I (PFGE) e os perfis de resistência a antibióticos. Analogamente, Wittwer *et al.* (2005) também não detectaram qualquer correlação entre a tipificação genética efectuada por AFLPs e RFLP-*fla*A e a resistência a antibióticos em isolados de frangos na Suíça.

Os resultados obtidos, no grupo de isolados analisados nesta dissertação, indiciam assim que a aquisição de resistência a antibióticos deve ter resultado maioritariamente de múltiplos eventos de transferência horizontal independentes e condicionados por diferentes pressões selectivas, resultantes do uso de antibióticos. No entanto, se a ausência de informação acerca do histórico das amostras (nomeadamente a referente ao uso de antibióticos na produção) impede por um lado a avaliação desta hipótese, por outro lado, a diversidade de amostras usadas (sobretudo em Angola) pode ser directamente responsável pela elevada diversidade genética encontrada nos isolados e pela não detecção de linhas clonais específicas entre os isolados de *C. jejuni* e *C. coli* analisados.

PARTE IV

ANÁLISE GLOBAL E CONCLUSÕES

As espécies *C. jejuni* e *C. coli* constituem um grupo de bactérias enteropatogénicas termófilas, frequentemente relatadas como uma das mais importantes causas das gastroenterites humanas nos países quer desenvolvidos quer em via de desenvolvimento (Skirrow & Blaser, 1992; Nielsen *et al.*, 2000).

Devido a sua importância clínica e epidemiológica, as bactérias do género *Campylobacter* requerem métodos rápidos, sensíveis capazes de identificar isolados pertencentes ao grupo enteropatogénico a nível de espécies e/ou diferenciar estes isolados a nível infra-específico.

Mas, problemas relacionados com a capacidade de tipificação, limitações na diferenciação das estirpes e reprodutibilidade inter ou mesmo intra-laboratorial estão entre as principais causas que têm dificultado a harmonização e a padronização destes métodos. Na verdade, tanto os estudos epidemiológicos como clínicos requerem métodos estáveis, simples e fáceis de manipular. Neste âmbito, o presente trabalho pretendeu dar um contributo na avaliação de métodos de caracterização fenotípica e molecular (identificação e diferenciação) dos isolados de *C. jejuni* e *C. coli*.

Ao longo da execução deste trabalho, os resultados obtidos demonstraram que a biotipagem é um método fenotípico estrategicamente importante no esquema de identificação e/ou tipificação dos isolados de *Campylobacter* enteropatogénicos, particularmente para *C. jejuni* e *C. coli*. Ela constitui uma mais valia e potencial ferramenta na identificação preliminar das estirpes destas duas espécies. Porém a sua utilização deve sempre ser acompanhada de outras técnicas mais estáveis, consistentes e fiáveis, como as baseadas em características moleculares.

Na verdade, tendo em conta que as bactérias deste género são assacarolíticas e que as duas mais importantes espécies do género, *C. jejuni* e *C. coli*, são muitas vezes distinguidas apenas por um único teste (hidrólise de hipurato de sódio), este método permitiu a obtenção de dados preliminares de identificação dos 187 isolados de *Campylobacter* spp. a nível de espécie, sobre os quais se basearam as etapas subsequentes do trabalho, nomeadamente a identificação e tipificação moleculares.

Com esta técnica, todos os isolados disponibilizados para este trabalho foram tipificados, obtendo-se uma capacidade de tipificação de 100%, embora se saiba que a elevada proporção de estirpes não tipificadas é um dos factores que limitam os métodos fenotípicos como a biotipagem e a serotipagem, geralmente utilizados na identificação e/ou diferenciação de *Campylobacter* spp..

No entanto, a identificação das estirpes obtida por biotipagem, muitas vezes considerada insegura e não fiável pelas razões acima já referidas foi avaliada com a utilização de um método molecular baseado em PCR-multiplex direccionado para o gene *gyrA* (*gyrA*-PCR), tendo-se alcançado uma congruência de 95% entre as duas abordagens utilizadas neste ponto de trabalho.

Isto significa que, nesta fase da pesquisa, os resultados obtidos indicavam que apenas 5% (10/187) da totalidade de isolados analisados por biotipagem não tiveram a sua identificação confirmada por *gyrA*-PCR, sendo todos da espécie *C. jejuni*, enquanto que para os 77 isolados de *C. coli* verificou-se uma concordância total da biotipagem e *gyrA*-PCR. Deste modo, a técnica de *gyrA*-PCR revelou-se uma alternativa eficiente.

Contudo, seria importante validar a técnica com estirpes de referência das várias espécies do género *Campylobacter* de modo a avaliar o seu potencial de identificação de outras espécies não incluídas no estudo efectuado. Adicionalmente, seria conveniente testar a sua aplicabilidade na análise directa de amostras, sem recorrer ao processo de isolamento prévio em cultura.,

Em geral, os resultados alcançados demonstraram que os métodos, quer fenotípicos como a biotipagem, quer moleculares que englobaram as técnicas de *gyrA*-PCR, ITS-ARDRA, RFLP-*flaA*, RAPD, Rep-PCR e M13-PCR, e que constituíram o suporte desta pesquisa, permitiram cumprir os principais objectivos preconizados para este trabalho, nomeadamente: (i) a identificação dos isolados ao nível das espécie; e (ii) a diferenciação dos isolados de cada uma das espécies identificadas (*C. jejuni* e *C. coli*).

Embora a avaliação da aplicabilidade dos métodos moleculares tenha confirmado que estes são tecnicamente precisos e simples, podendo ser executados em menos tempo que os métodos convencionais (Olive & Bean, 1999), os métodos de análise de polimorfismos de restrição das regiões intergénicas ribossomais (ITS) e do gene da flagelina (*flaA*) foram os únicos que falharam na obtenção dos resultados esperados.

De facto, tanto ITS-ARDRA como RFLP-*flaA*, com capacidade reconhecida quer para a identificação quer para a tipificação das estirpes de diversos grupos microbianos (Christensen *et al.*, 1999; Fitzgerald *et al.*, 2001), não foram capazes de gerar perfis de bandas específicos como marcadores moleculares para identificar as espécies, pois nos diferentes agrupamentos detectados foram encontradas estirpes pertencentes a ambas as espécies de *Campylobacter*.

No caso de RFLP-*flaA*, os resultados obtidos contrariam Comi *et al.* (1996) que, utilizando as endonucleases *HinfI* e *AluI* na digestão de *flaA*, obtiveram resultados que permitiram distinguir estirpes de *C. jejuni* das de *C. coli* mas apresentando um poder de discriminação muito reduzido a nível infra-específico.

No entanto, em relação à discriminação a nível infra-específico, existem estudos nos quais esta técnica já demonstrou possuir um elevado poder de discriminação das estirpes de *Campylobacter* spp. (Burnens et al. 1995), ainda que o seu poder de discriminação dependa, não só das endonucleases envolvidas, mas também de outros factores tais como o processo de digestão (simples, dupla ou múltipla) e as condições técnico-materiais disponíveis para o ensaio.

Por outro lado, dos escassos trabalhos existentes sobre a análise de *Campylobacter* spp. por ITS-ARDRA, destaca-se o de Christensen et al. (1999) que, apesar de ter detectado um número muito reduzido de perfis de restrição com as enzimas *Sau3AI* e *HaeIII*, implicando um baixo poder discriminante desta técnica, demonstrou a sua capacidade de distinguir entre isolados de *Campylobacter* termófilos, particularmente entre *C. jejuni* e *C. coli*.

Assim, os resultados obtidos por Christensen et al. (1999) corroboraram os da presente dissertação apenas na avaliação do poder da diferenciação entre isolados das espécies em estudo, pois tanto num como noutro o número de perfis de restrição detectados foi muito inferior ao esperado, enquanto que se verificou uma clara discordância entre eles no que respeita a identificação das estirpes a nível de espécie.

Foi importante notar que estas duas técnicas falharam também na capacidade de tipificação, pois apenas 89,8 % (168/187) e 95,7% (179/187) dos isolados foram tipificáveis por ITS-ARDRA e RFLP-*flaA*, respectivamente. Esta situação contaria os pressupostos geralmente aceites de que os métodos moleculares, sendo baseados em caracteres estáveis (DNA, RNA, etc.), permitem uma redução drástica das elevadas proporções de estirpes não tipificadas que caracterizam os métodos fenotípicos (Duim et al., 1999; Olive & Bean, 1999).

Ainda que estes métodos tenham demonstrado capacidade suficiente de tipificação em alguns estudos de *Campylobacter* spp. (Nielsen et al., 2000; Fitzgerald et al., 2001; Ertas et al., 2004), outros trabalhos também registam a incapacidade de tipificação de algumas estirpes por RFLP-*flaA* (Wittwer et al., 2005; Zorman et al., 2006).

No entanto, várias razões podem estar na origem das incongruências que se verificam entre os resultados de diferentes trabalhos, pelo que é muito importante lembrar que além dos “primers” e das endonucleases utilizados, outros factores relacionados com os procedimentos técnicos (amostragem, equipamentos, etc.) inerentes quer ao factor humano, quer laboratorial, podem influenciar os resultados obtidos nestas técnicas.

No caso de ITS-ARDRA, o facto do número de cópias de genes *rrn* presentes e a distância que os separam no cromossoma bacteriano variarem, não só de acordo com a espécie, mas também de uma estirpe para outra, tem sempre um peso considerável na determinação do número de fragmentos ou produtos de amplificação da região ITS e, consequentemente, na análise dos perfis de digestão.

Um dos objectivos deste trabalho foi o de avaliar a diversidade genómica das estirpes identificadas nas duas espécies de *Campylobacter* em estudo. Por isso, vários métodos moleculares baseados numa análise de “PCR-fingerprinting” tais como RAPD, Rep-PCR e M13-PCR foram incluídos nesta pesquisa. Assim, através dos índices de Simpson e de Shannon-Wiener, pretendia-se determinar a sua eficiência relativa na estimativa da diversidade existente entre as estirpes de *Campylobacter* spp. em análise neste trabalho.

Na verdade, nas investigações de ecologia, epidemiologia e análise de populações microbianas, é muitas vezes necessário e útil identificar as diferenças genéticas que discriminam entre microorganismos proximamente relacionados e altamente semelhantes. E, em muitas das técnicas utilizadas nestes estudos, verifica-se muitas vezes uma perda de sensibilidade para discriminar as estirpes altamente relacionadas ou mesmo que as técnicas são inconvenientes (Ralph & McClland, 1998).

Como se sabe, um elevado índice de diversidade não só indica uma maior capacidade de discriminação da técnica mas também reflecte a heterogeneidade genética do grupo em estudo (Hilton *et al.*, 1997). E, com os resultados obtidos na aplicação das técnicas de “PCR-fingerprinting” ficou demonstrada a heterogeneidade genómica existente entre as estirpes de *C. jejuni* e *C. coli*, pelo que se confirmou o elevado potencial discriminante das referidas técnicas como tem sido descrito por muitos investigadores (Hernandez *et al.*, 1995; Hilton *et al.*, 1997; Tu *et al.*, 2005; Açik *et al.*, 2006).

Sabe-se que valores do índice de diversidade de Simpson superiores a 0,9 são recomendáveis para que os resultados obtidos numa técnica de diferenciação sejam interpretados com confiança (Hunter & Gaston, 1988). Em geral, apurou-se que as técnicas de “PCR-fingerprinting” foram as mais discriminantes de todos ensaios que foram utilizados neste trabalho para a diferenciação das estirpes de *C. jejuni* e *C. coli*, tal como se pode verificar pelos valores dos índices de Simpson obtidos, que variaram entre 0,973 e 0,995 para *C. jejuni* e entre 0,922 e 0,989 para *C. coli*.

Em comparação com outras técnicas moleculares constatou-se que, além do poder de diferenciação mais elevado relativamente às outras técnicas de “PCR-fingerprinting”, nomeadamente Rep-PCR e M13-PCR, os resultados da análise por RAPD demonstraram ainda que esta técnica foi mais discriminante que as técnicas de ITS-ARDRA e RFLP-*flaA*, em concordância com o descrito por outros investigadores (Fayos *et al.*, 1992; Hilton *et al.*, 1997; Nielsen *et al.*, 2000; Ono *et al.*, 2003).

Na verdade e de acordo com Wassenaar & Newell (2000), a maior discriminação das estirpes detectada na aplicação de RAPD deve-se ao facto de estar direccionada para o genoma global e não para uma curta sequência específica (genes ou outros fragmentos genómicos) como acontece com as técnicas de restrição, designadamente ITS-ARDRA e RFLP-*flaA*.

Ainda para a técnica de RAPD, sabe-se que a utilização da temperatura baixa de 36°C deve ter permitido o emparelhamento ou hibridação “errada” dos primers com o DNA-molde, originando um elevado número de bandas cuja interpretação se torna difícil para a análise. Por esta razão, o poder de reprodutibilidade desta técnica não é dos melhores entre os métodos de diferenciação das estirpes.

A eficácia de aplicabilidade da técnica de Rep-PCR na discriminação das estirpes foi demonstrada em diversas espécies bacterianas, revelando ter um melhor poder discriminante que muitas técnicas moleculares, tais como a análise de restrição do gene de RNA 16S ou da região ITS (Vila *et al.*, 1996; Appuhamy *et al.*, 1997), e equivalente a outras técnicas direccionadas para sequências repetidas do genoma como ERIC-PCR (Lentzsch *et al.*, 2004; Mowen *et al.*, 2005).

Esta ideia foi reforçada pelos resultados obtidos neste trabalho em que o ensaio de Rep-PCR demonstrou claramente ser mais discriminante que a análise de ITS-ARDRA. No entanto, a técnica de Rep-PCR demonstrou também maior poder discriminante que a técnica de RFLP-*flaA*.

É interessante lembrar que o facto da técnica de Rep-PCR consistir na utilização de “primers” dirigidos a regiões palindrómicas de sequências extragénicas repetidas do DNA bacteriano não pode ser considerado um factor limitante na determinação do poder discriminante, uma vez que estas sequências estão em elevado número de cópias que são encontradas em diversas localizações no cromossoma, proporcionando maior possibilidade de hibridação dos “primers”.

A técnica é rápida, fácil de ser utilizada e com excelente reprodutibilidade, tal como foi demonstrado na diferenciação de estirpes de outras espécies bacterianas, nomeadamente *Helicobacter pylori* (Kwon *et al.*, 1998), *Bacillus subtilis* (Versalovic *et al.*, 1991) e *Citrobacter diversus* (Woods *et al.*, 1992).

Entretanto, muito mais vantajoso e rápido seria ainda, se fosse utilizada, sobretudo para os estudos epidemiológicos e clínicos, a sua versão modificada e mais económica (Woods *et al.*, 1993) que não inclui a extracção de DNA no seu protocolo, evitando assim um consumo desnecessário de tempo.

Apesar de não se terem sido encontrados relatos da aplicabilidade de M13-PCR como ensaio “de fingerprinting” para as bactérias do género *Campylobacter*, esta técnica provou aqui, particularmente com as estirpes de *C. jejuni* e *C. coli*, uma enorme capacidade de discriminação.

Tal como no caso das sequências REP, o “primer” M13 é dirigido para uma sequência específica de cópias múltiplas posicionadas de forma dispersa no cromossoma bacteriano. Por outro lado, o número de cópias, a localização e a dimensão, que geralmente variam por espécie, são capazes de gerar polimorfismos genómicos que podem ser utilizados para identificar e diferenciar estirpes bacterianas.

Em comparação com outras técnicas de “PCR-fingerprinting” também utilizadas na avaliação da diversidade genómica dos isolados de *Campylobacter* spp. em análise, foi evidente que esta técnica é tão discriminante quanto RAPD e Rep-PCR. O mesmo se pode dizer em relação ao grau de reprodutibilidade, capacidade de tipificação, simplicidade e rapidez na execução.

Finalmente, a opção de uma análise combinada das técnicas de “PCR-fingerprinting” (RAPD, Rep-PCR e M13-PCR) demonstrou como a utilização da abordagem polifásica pode ser vantajosa para aumentar a discriminação, constituindo uma ferramenta muito útil em estudos epidemiológicos e de rastreabilidade. Com um valor estimado em 0,999 do índice de Simpson, esta análise conseguiu praticamente diferenciar cada isolado em cada uma das espécies.

É claro que existem outros métodos moleculares, tais como análise de macrorestrição por PFGE, AFLPs e MLST (“Multi-locus sequence typing”) que são potencialmente muito discriminantes e têm sido usados com sucesso na tipificação de *Campylobacter* spp. (Duijm *et al.*, 2001; Lentzsch *et al.*, 2004; Wittwer *et al.*, 2005; Ogden *et al.*, 2007), mas a sua utilização pode ser preterida pela maior complexidade associada, morosidade e elevados custos de equipamento e consumíveis para a sua execução.

Relativamente às origens geográficas das amostras (Angola e Portugal), e com todas as técnicas utilizadas na análise de polimorfismos de restrição (ARDRA e RFLP-*flaA*) e de “PCR-fingerprinting” (RAPD, Rep-PCR e M13-PCR), não foi possível estabelecer uma correlação entre isolados e a origem das amostras, embora em alguns casos se tenham detectado agrupamentos com predominância de isolados provenientes da mesma origem.

Finalmente, a comparação entre tipos genómicos estabelecidos por “PCR-fingerprinting” e perfis de resistência a antibióticos não revelou qualquer associação, indiciando assim que a aquisição de resistência a antibióticos deve ter resultado maioritariamente de múltiplos eventos de transferência horizontal independentes e condicionados por diferentes pressões selectivas, resultantes do uso de antibióticos. No entanto, a ausência de informação acerca do histórico das amostras (nomeadamente a referente ao uso de antibióticos na produção) constituiu um factor limitante na detecção de linhas clonais específicas entre os isolados de *C. jejuni* e *C. coli* analisados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Açik, M.N. and Çetinkaya, B.** (2006) – Random amplified polymorphic DNA analysis of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from healthy cattle and sheep. *J. Med. Microbiol.* **55**: 331-334.
- Aho, M., Kurki, M., Rautelin, H. and Kosunen, T.U.** (1989) – Waterborne outbreak of *Campylobacter* enteritis after outdoors infantry drill in Utti, Finland. *Epidemiol Infect.* **103**: 133-141.
- Akopyanz, N., Bukanov, N.O., Westblom, T.U. and Berg, D.E.** (1992a) - PCR-based RFLP analysis of DNA sequence diversity in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nucl. Acids Res.* **20**: 6221-6225.
- Akopyanz, N., Bukanov, N.O., Westblom, T.U., Kresovitch, S. and Berg, D.E.** (1992b) – DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR- based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* **20**: 5137-5142.
- Allos, B.M. and Blaser, M.J.** (1995) – *Campylobacter jejuni* and the expanding spectrum of related infections. *Clin. Infect. Dis.* **20**: 1092-1101.
- Alm, R.A., Guerry, P. and Trust, T.J.** (1993) – Distribution and polymorphism of the flagellin genes from isolates of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni*. *J. Bacteriol.* **175**: 3051-3057.
- Amin, N.M.** (1984) - *Campylobacter*–caused diarrhea. Who is at risk? What to wash for. *Postgrad. Medicine.* **75**: 89-93, 96-97.
- Anónimo** (2000) - Annual report on zoonoses in Denmark 1999, p. 1-28. Danish zoonosis Centre, Danish Veterinary Laboratory, Copenhagen, Denmark. <http://zoonyt.dzc.dk/annualreport1999>.
- Appuhamy, S. Parton, R., Coote, J.G. and Gibb, H.A.** (1997) – Genomic fingerprinting of *Haemophilus soumnu*s by a combination of PCR methods. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 288-291.
- Arp, L.H.** (1988) – Bacterial infection of mucosal surfaces: an overview of cellular and molecular mechanisms. In: *Virulence mechanisms of bacterial pathogens*. pp 3-19.. James A. Roth ed. ASM, Washington.
- Bacon, D.J., Alm, R.A., Burr, D.H., Hu, L., Kopecko, D.J., Ewing, C.P., Trust, T.J. and Guerry, P.** (2000) – Involvement of plasmid in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. *Infect. Immun.* **68**: 4384 – 4390.
- Bänffer, J.R.** (1985) – Biotypes and serotypes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains isolated from patients, pigs and chickens in the region of Rotterdam. *J. Infect.* **10**: 277-281.
- Bang, D.D., Nielsen, E.M., Scheutz, F., Pedersen, K., Handberg, K. and Madsen, M.** (2003) – PCR detection of seven virulence and toxin genes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from Danish pigs and cattle and cytolethal distending toxin production of the isolates. *J Appl. Microbiol.* **94**: 1003–1014.
- Bang, D.D., Scheutz, F., Ahrens, P., Pedersen, K., Blom, J. and Madsen, M.** (2001) – Prevalence of cytolethal distending toxin (*cdt*) genes and CDT production in *Campylobacter* spp. isolate from Danish broilers. *J. Med. Microbiol.* **50**: 1087 – 1094.
- Bastyns, K., Chapelle, S., Vandamme, P., Goossens, H. and Wachter, R.** (1994) – Species-specific detection of *Campylobacter* infections in veterinary medicine by PCR amplification of 23s rRNA areas. *System. Appl. Microbiol.* **17**: 563-568.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C. and Turck, M.** (1966) - Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* **45**: 493-496.
- Benjamim, J., Leaper, S., Owen, R.J. and Skirrow, M.B.** (1983) – Description of *Campylobacter laridis*, a new species comprising the Nalidixic Acid Resistant Thermophilic *Campylobacter* (NARTC) Group. *Curr. Microbiol.* **8**: 231-238.
- Beery, J.T., Hugdahl, M.B. and Doyle, M.P.** (1988) – Colonization of gastrointestinal tracts of chicks by *Campylobacter jejuni*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 2365-2370.
- Beumer, R.R., Cruysen, J.J. and Britantie, I.R.** (1988) – The occurrence of *Campylobacter jejuni* in cows milk. *J. Appl. Bacteriol.* **65**: 93- 96.
- Birkenhead, D., Hawkey, P.M., Heritage, J., Gascoyne-Binzi, D.M. and Kite, P.** (1993) – PCR for the detection and typing of *Campylobacters*. *Lett. Appl. Microbiol.* **17**: 235-237.
- Black, R.E., Levine, M.M., Clements, M.L., Hughes, T.P. and Blaser, M.J.** (1988) – Experimental *Campylobacter jejuni* infections in humans. *J. Infect. Dis.* **157**: 472-479.

- Blaser, M.J.** (1980) – *Campylobacter fetus*. The need of surveillance from the center for disease control. *News. J. Infect. Dis.* **141**: 5.
- Blaser, M.J.** (1982) - *Campylobacter jejuni* and food. *Food Technology*. March. 89-92.
- Blaser, M.J.** (1988) – *Campylobacter*. In: *Enteric infection: mechanisms, manifestations, and management*. Cap. 21. Farthing, M.J.G. and Keush, G., Eds. Chapman and Hall, Ltd. London.
- Blaser, M.J., Black, R.E., Duncan, D.J. and Amer, J.** (1985) – *Campylobacter jejuni*-specific serum antibodies are elevated in healthy Bangladeshi children. *J.Clin. Microbiol.* **21**: 164-167.
- Blaser, M.J., Cravens, J., Powers, B.W., LaForce, F.M. and Wang, W.L.** (1979) - *Campylobacter* enteritis associated with unpasteurized milk. *Am. J. Med.* **67**: 715-718.
- Blaser, M.J., Hardesty, H.L., Power, B. and Wang, W.L.** (1980a) – Survival of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* in biological milieus. *J. Clin. Microbiol.* **11**: 309-313.
- Blaser, M.J., LaForce, F.M., Wilson, N.A. and Wang, W.L.** - (1980b) Reservoirs for human campylobacteriosis. *J. Infect. Dis.* **141**: 665-669.
- Blaser, M. J., Taylor, D. N., and Feldman, R. A.** (1984) - Epidemiology of *Campylobacter* infection. In: *Campylobacter in man and animals*. Cap. 13, pp 143-162. Butzler, J.P., CRC Press, Inc, Boca-Raton, Florida.
- Blaser, M.J., Wells, J.G., Feldman, R.A., Pollard, R.A. and Allen, J.R.** (1983) – *Campylobacter* enteritis in the United States. A multicenter study, *Ann. Int. Med.* **98**: 360-365.
- Bokkenheuser, V.D., Richardson, N.J., Bryner, J.H., Roux, D.J., Schutte, A.B., Koornhof, H.J., Freiman, I., and Hartman, E.** (1979) - Detection of enteric *Campylobacteriosis* in children. *J. Clin. Microbiol.* **9**: 227 –232.
- Bolton, F.J., Dawkins, H.C. and Robertson, L.** (1982) - *Campylobacter jejuni/coli* in abattoirs and butchers shops. *J. Infect.* **4**:243 – 245.
- Bolton, F.J. and Robertson, L.,** (1982) – A selective medium for isolating *Campylobacter jejuni*. In: *Campylobacter Epidemiology, Pathogenesis and Biochemistry*, Newell, D.G., Ed., MTP Press, Lancaster, U. K.
- Bolton, F.J., Coates, D. and Hutchinson, D.N.** (1984) – The ability of *Campylobacter* media supplements to neutralize photochemically induced toxicity and hydrogen peroxide. *J. Appl. Bacteriol.* **56**: 151-157.
- Bolton, F.J., Hutchinson, D.N. and Parker, G.** (1987) – Isolation of *Campylobacter*. What are we missing? *J. Clin. Pathol.* **40**: 702-703.
- Borst, P. and Greaves, D.R.** (1987) – Programmed gene rearrangements altering gene expression. *Science.* **235**: 658-667.
- Bourke, B., Sherman, P.M., Woodward, D., Lior, H. and Chan, V.L.** (1996) – Pulsed-field gel electrophoresis indicates genotypic heterogeneity among *Campylobacter upsaliensis* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **143**: 57-61.
- Bowler, I. and Day, D.** (1992) - Emerging quinolone resistance in *Campylobacter*. *Lancet.* **340**: 245.
- Brenner, D. J., McWhorter, A. C., Knutson, J. K. and Steigerwalt, A. G.** (1982). *Escherichia vulneris*: a new species of Enterobacteriaceae associated with human wounds. *J. Clin. Microbiol.* **15**: 1133–1140.
- Bruce, D., Zochowski, W. and Fleming, G. A.** (1980) – *Campylobacter* infections in cats and dogs. *Vet. Rec.* **107**: 200 – 201.
- Bruce, D., Zochowski, W. and Ferguson, I. R.** (1977) – *Campylobacter* enteritis. *British Med. J.* **2**: 1219.
- Brunton, W.A, Wilson, A.M. and Macrae, R.M.** (1978) - Erythromycin-resistant *Campylobacters*. *Lancet* **2**: 1385.
- Burdett, V.** (1986) - Streptococcal tetracycline resistance mediated at the level of proteins synthesis. *J. Bacteriol.* **165**: 564-569.
- Burnens, A.p., Wagner, J., Lior, H., Nicolet, J. and Frey, J.** (1995) – Restriction fragment length polymorphism among the flagellar genes of the Lior heat-labile serogroup reference strains and field strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Epidemiol. Infect.* **114**: 423-431.
- Burridge, R., Warren, C., and Phillips, I.** (1986) - Macrolide, lincosamide and streptogramin resistance in *Campylobacter jejuni/coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* **17**: 315-321.

- Bustamante, V.H., Puente, J.L., Sánchez-López, F., Bobadilla, M. and Calva, E.** (1995) – Identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* using the *rpoB*, gene and cryptic DNA fragment from *C. jejuni*. *Gene*. **165**: 1-8.
- Butzler, J. P. and Skirrow, M. B.** (1979) – *Campylobacter* enteritis. *Clin. Gastroenterol.* **8**: 737-765.
- Cabrita, J.** (1986) - Incidência de *Campylobacter* em canídeos sem sinais clínicos na região de Lisboa. *Rev. Port. Doenças. Infect.* **9**: 8 –10.
- Cabrita, J., Pires, I., Vlaes, L., Coignau, H., Levy, J., Goossens, H., Gonçalves, A.P., de Mol, P. and Butzler, J.P.,** (1992a) – *Campylobacter* enteritis in Portugal: epidemiological features and biological markers. *Eur. J. Epidemiol.* **8** (1) : 22-26.
- Cabrita, J., Rodrigues, J., Bragança, F., Morgado, C., Pires, I. and Gonçalves, A.P.** (1992b) – Prevalence, biotypes, plasmid profiles and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolated from wild and domestic animals from northeast Portugal. *J. Appl. Bacteriol.* **73**: 279-285.
- Caldwell, M.B., Guerry, P., Lee, E.C., Burans, J.P. and Walker, R.I.** (1985) – Reversible expression of flagella in *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immunol.* **50**: 941-943.
- Cardinale, E., Rose, V., Perrier Gros-Claude, J.D., Tall, F., Rivoal, K., Mead, G. and Salvat, G.** (2006) – Genetic characterization and antibiotic resistance of *Campylobacter* spp. Isolated from poultry and humans in Senegal. *J. Appl. Microbiol.* **100**: 209-217.
- Carvalho, A.C.T., Ruiz-Palacios, G.M., Ramos-Cervantes, P., Cervantes, L-E. Jiang, Xi and Pickering, L.K.** (2001) – Molecular characterization of invasive and noninvasive *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates. *J. Clin. Microbiol.* **39** : 1353-1359.
- CDC, Centers for Disease control** (1981a) – Outbreak of *Campylobacter* enteritis associated with raw milk, Kansas, *MMWR*, **30**: 218.
- CDC, Centers for Disease control** (1981b) - Raw-milk associated illness – Oregon, *MMWR*, **30**, 90.
- Chambel, L., Sol, M., Fernandes, I., Barbosa, M., Zilhão, I., Barata, B., Jordan, S., Perni, S., Shama, G., Adrião, A., Faleiro, L., Requena, T., Peláez, C., Andrew, P. A. and Tenreiro, R.** (2007) - Occurrence and persistence of *Listeria* spp. in the environment of ewe and cow's milk cheese dairies in Portugal unveiled by an integrated analysis of identification, typing and spatial-temporal mapping along production cycle. *Int. J. Food Microbiol.* **116**: 52-63.
- Chart, H. Frost, J.A., Oza, A., Thwaites, R., Gillanders, S. and Rowe, B.** (1996) – Heat-stable serotyping antigens expressed by strains of *Campylobacter jejuni* are probably capsular and not long-chain lipopolysaccharide. *J. Appl. Bacteriol.* **81**:635-640.
- Charvalos, E., Tselentis, Y., Hamzehpour, M.M., Köhler, T. and Pechere, J.C.** (1995) - Evidence for an efflux pump in multidrug-resistant *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**: 2019-2022.
- Chopra, I., Hawkey, P. M., and Hinton, M.** (1992) – Tetracyclines: molecules and clinical aspects. *J. Antimicrob. Chemother.* **29**: 245-277.
- Christensen, H., Jorgensen, K. and Olsen, J.E.** (1999) - Differentiation of *Campylobacter coli* and *C. jejuni* by length and DNA sequence of the 16S-23S rRNA internal spacer region. *Microbiology* **145**: 99-105.
- Col, N.F. and O'Connor, R.W.** (1987) – Estimating worldwide current antibiotic usage: Report of task force 1. *Rev. Infect. Dis.* **9**: S232-243.
- Comi, G., Pipan, C., Botta, G., Cocolin, L., Cantoni, C. and Manzano, M.** (1996) – A combined polymerase chain reaction and restriction endonuclease enzyme assay for discriminating between *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **16**: 45-49.
- Conceição, T., Brizio, A., Duarte, A., and Barros, R.** (2005) – First isolation of blaVIM-2 in *Klebsiella oxytoca* clinical isolates from Portugal. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 476.
- Cox, J.M., Ketley, J.M. and Williams, P. H.,** (1996) – Cloning the flagellin genes of *Campylobacter upsaliensis*. In: *Campylobacters, Helicobacters, and related organisms*. pp. 569-573. Newel, D.G., Ketley, J.M., and Feldman, R.A. eds. Plenum Press, New York.
- Cruickshank, J.G., Egglestone, E.I., Gawlr, A.H.L. and Lanning, D.G.** (1982) – *Campylobacter jejuni* and the broiler chicken process. In: *Campylobacter Epidemiology, Pathogenesis and Biochemistry*. Cap. 96, pp. 263-266. Newell, D.G., Ed. M.T.P. Press Ltd. Boston.

- Daneshvar, M.I., Hill, B., Hollis, D.G., Moss, C.W., Jordan, J.G., Macgregor, J.P., Tenover, F. and Weyant, R.S.** (1998) - CDC group O-3: phenotypic characteristics, fatty acid composition, isoprenoid quinone content, and in vitro antimicrobial susceptibilities of an unusual Gram-negative bacterium isolated from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 1674-1676.
- De Mol, P., and Bosmans, F. E.** (1978) – *Campylobacter* enteritis in central Africa. *The Lancet.* **1**: 604.
- Dekeyser, P. Gossuin-Detrain, M., Butzeler, J.P. and Sternon, J.** (1972) – Acute enteritis due to related vibrio: first positive stool cultures. *J. Infect. Dis.* **125**: 390-392.
- Deming M.S., Tauxe, R.V., Blake, P.A., Dixon, S.E., Fowler, B.S., Jones, T.S., Lockamy E.A., Patton, C.M. and Sikes, R.O.** (1987) - *Campylobacter* enteritis at a University: Transmission from eating chicken and fro cats. *Am. J. Epidemiol.* **126**: 526-534.
- Denes, A. S., Lutze-Wallace, C.L., Cormier, M.L. and Garcia, M.M.** (1997) – DNA fingerprinting of *Campylobacter fetus* using cloned constructs or ribosomal RNA and surface array protein genes. *Vet. Microbiol.* **54**:185-193.
- Denis, M., Soumet, C., Rivoal, K., Ermel, G., Blivet, D., Salvat, G. and Collin, P.** (1999) – Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* **29**: 406-410.
- Dmiri, G.P., Rudd, K.E., Morgan, M.K., Bayat, H. and Ames, G.F.** (1992) – Physical mapping of repetitive extragenic palindromic sequences in *Escherichia coli* and phylogenetic distribution among *Escherichia coli* strains and other enteric bacteria. *J. Bacteriol.* **174**: 4583-4593.
- Douglas, L.A. and Kvenberg, J.E.** (1985) – Incidence and cost of foodborne diarrheal disease in United States. *J. Food. Protect.* **48**: 887-894.
- Doyle, L.** (1944) – A *Vibrio* associated with swine dysentery. *Am.J. Vet. Res.* **5**: 3-5.
- Doyle, M. P., and Roman, D. J.** (1981) – Growth and survival of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* as a function of temperature and pH. *J. Food Prot.* **44**: 596-601.
- Doyle, M.P. and Roman, D.J.** (1982) – Prevalence and survival of *Campylobacter jejuni* in unpasteurized milk. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 1154-1158.
- Duim, B., Wassenaar, T.M.; Rigter, A. and Wagenaar, J.** (1999) – High-Resolution Genotyping of *Campylobacter* strains isolated from poultry and humans with amplified fragment length polymorphic fingerprinting. *Appl. Envir. Microbiol.* **65**: 2369-2375.
- Edmonds, P. Patton, C. M., Griffen, P.M., Barrett, T.J., Schmid, G. P., Baker, C.N., Lambert, A.M., and Brenner, D. J.** (1987) *Campylobacter hyointestinalis* associated with human gastrointestinal disease in the United States. *J. Clin. Microbiol.* **25**: 685-691.
- Elaichouni, A., Verschragen, G., Clayes, G., Devleeschouwer, M., Godard, C. and Vaneechoutte, M.** (1994) – *Pseudomonas aeruginosa* serotype O12 outbreak studied by arbitrary primer PCR. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 666-671.
- Elharrif, Z. and Mégraud, F.** (1986) – Characterization of thermophilic *Campylobacter*. I. Carbon-substrate utilization tests. *Curr. Microbiol.* **13**: 117-122.
- Ellis, W.A., Neill, S.D., O'Brien, J.J. and Hanna, J.** (1978) - Isolation of *Spirillum/Vibrio*-like organisms from pig fetuses. *Vet. Rec.* **102**: 106.
- Ellis, W.A., Neill, S.D., O'Brien, J.J., Ferguson H.W., and Hanna, J.** (1977) – Isolation of *Spirillum/Vibrio*-like organisms from bovine fetuses. *Vet. Rec.* **100**: 451-452.
- Ely, B., and Shapiro, L.** (1984) – Regulation of cell differentiation in *Caulobacter crescentus*. In: *Microbial development*, pp. 1-26. R. Losick and L. Shapiro Eds, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Endtz, H.P, Ruijs, G.J., Van Klingerren, B., Jansen, W.H., Van der Reyden, T. and Mouton, R.P.** (1991) - Quinolone resistance in *Campylobacter* isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine. *J. Antimicrob. Chemother.* **27**: 199-208.
- Endtz, H.P., Giesendorf, B.A., van Belkum, A., Lauwers, S.J., Jansen, W.H. and Quint, W.G.** (1993) – PCR-mediated DNA typing of *Campylobacter jejuni* isolated from patients with recurrent infections. *Res. Microbiol.* **144**: 703-708.
- Endtz, H.P., Vilegenthart, J.S., Vandamme, P., Weverink, H.W., Van Den Braak, N.P., Verbrugh, H.A. and Van Belkum, A.** (1997) – Genotypic diversity of *Campylobacter lari* isolated from mussels and oysters in the Netherlands. *Int. J. Food. Microbiol.* **34**: 79-88.

- Engberg, J., Aaerstrup F.M., Taylor D.E., Gerner-Smidt, P. and Nachamkin, I. (2001) – Quinolone and macrolides resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: resistance mechanisms and trends in human isolates. *Emerg. Infect. Dis.* **7**: 24-34.
- Ertas, H. B., Çetinkaya, B., Muz, A. and Ongör, H. (2004) - Genotyping of broiler-originated *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates using *fla* typing and random amplified polymorphic DNA methods. *Int. J. Food Microbiol.* **94**: 203-209.
- Eyers, M., Chapelle, S., Van Camp, G., Goossens, H. and De Wachter, R. (1993) – Discrimination among thermophilic *Campylobacter* species by polymerase chain reaction amplification of 23s rRNA gene fragments. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 3340-3343.
- Fang, S.W., Yang, C.J., Shih, D.Y.C, Chou, C.C. and Yu, R.C. (2006) – Amplified fragment length polymorphism, serotyping, and quinolone resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains from chicken-related samples and humans in Taiwan. *J. Food Prot.* **69**: 775-783.
- Fayos, A., Owen, R.J., Desai, M. and Hernandez, J. (1992) – Ribosomal RNA gene restriction fragment diversity amongst Lior biotypes and Penner serotypes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *FEMS. Microbial. Lett.* **95**: 87-93.
- Fedorov, O.V., Kostyukova, A.S. and Pyatibratov, M. G. (1988) – Architectonics of a bacterial flagellin filament subunit. *FEBS Lett.* **241**: 145-148.
- Fennell, C.L., Totten, P.A., Quinn, T.C., Patton, D.L., Holmes, K.K. and Stamm, W.E. (1984) – Characterization of *Campylobacter*-like organisms isolated from homosexual men. *J. Infect. Dis.* **20**: 453-460.
- Fischer, S.H. and Nachamkin, I. (1991) – Common and variable domains of the flagellin gene, *flaA*, in *Campylobacter jejuni*. *Mol. Microbiol.* **5**: 1151-1158.
- Fitzgerald, C., Helsel, L. O., Nicholson, M.A., Olsen, S.J., Swerdlow, D.L., Flahart, R., Sexton, J. and Fields, P.I. (1996) – Evaluation of methods for subtyping *Campylobacter jejuni* during an outbreak involving a food handler. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 2386-2390.
- Fitzgerald, C., Stanley, K., Andrew, S., and Jones, K. (2001) – Use of pulsed-field gel electrophoresis and flagellin gene typing in identifying clonal groups of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in farm and clinical environments. *J. Clin. Microbiol.* **67** (4): 1429-1436.
- Florent, A. (1953) – Isolement d'un vibron saprophyte du sperme et du vagin de la vache (*Vibrio bubulus*). *C. R. Soc. Biol.* **147**: 2066-2069.
- Foster, G., Holmes, B., Steigerwalt, A.G., Lawson, P.A., Thorne, P., Byrer, D.E., Ross H.M., Xerry, J., Thompson, P.M. and Collins, M.D. (2004): *Campylobacter insulaenigrae* sp. nov., isolated from marine mammals. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 2369-2373..
- Fox, J.G., Chilvers, T., Goodwin, C.S., Taylor N.S., Edmonds, P., Sly, L.I. and Brenner, D.J. (1989) – *Campylobacter mustelae*, a new species resulting from the elevation of *Campylobacter pylori* subsp. *mustelae* to species status. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**: 301-303.
- Fox, J.G., Edrize, B.M., Cabot, E.B., Beaucage, C., Murphy, J.C. and Prostak, K.S. (1986) – *Campylobacter*-like organisms isolated from gastric mucosa in ferrets. *Am. J. Vet. Res.* **47**: 236-239.
- Fox, J.G., Moore, R. and Ackerman, J.I. (1983). – Canine and feline: epizootology and clinical and public health features. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **183**: 1420 – 1424.
- Fox, J.G., Taylor, N.S., Edmonds, P. and Brenner, D.J. (1988) – *Campylobacter pylori* subsp. *mustelae* subsp. nov. isolated from the gastric mucosa of ferrets (*Mustela putorius furo*) and an emended description of *Campylobacter pylori*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**: 367-370.
- Franco, D.A. (1988) - *Campylobacter* species: considerations for controlling a food borne pathogen. *J. Food Protect.* **51**: 145-153.
- Fraser, A.D., Chandan, V., Yamazaki, H., Brooks, B.W. and Garcia, M.M. (1992) – Simple and economical culture of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in CO₂ in moist air. *Int. J. Food Microbiol.* **15**: 377-382.
- Frost, J.A., Oza, A.N., Thwaites, R.T. and Rowe, B. (1998) – Serotyping scheme for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* based on direct agglutination of heat-stable antigens. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 335-339.
- Fujita, M., Fujimoto, S., Marooka, T. and Amako, K. (1995) – Analysis of strains *Campylobacter fetus* by pulsed field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 1676-1678.

- Gaunt, P.N. and Piddock, L.J.V.** (1996) - Ciprofloxacin resistance *Campylobacter* spp. in humans: epidemiological and laboratory study. *J. Antimicrob. Chemother.* **37**: 747-745.
- Gebhart, C.J., Edmonds, P., Ward, G.E., Kurtz, H.J. and Brenner, D.J.** (1985) – “*Campylobacter hyointestinalis*” sp. nov.: a new species of *Campylobacter* found in the intestines of pigs and other animals. *J. Clin. Microbiol.* **21**: 715 – 720.
- Gebhart, C.J., Fennell, C.L., Murtaugh, M.P. and Stamm, W. E.** (1989) –*Campylobacter cinaedi* is the normal intestinal flora in hamsters. *J. Clin. Microbiol.* **27**: 1692-1694.
- Gebhart, C.J., Ward, G.E., Chang, K. and Kurtz, H.J.** (1983) – “*Campylobacter hyointestinalis*” (new species) isolated from swine with lesions of proliferative ileitis. *Am. J. Vet. Res.* **44**: 361-367.
- George, H.A., Hoffman, P.S., Smibert, R.M. and Krieg, N.R.** (1978) – Improved media for growth and aerotolerance of *Campylobacter fetus*. *J. Clin. Microbiol.* **8**: 36-41.
- Georges, R. C.** (1998) – Impact of molecular methods on clinical Bacteriology. In: *Molecular Bacteriology: protocols and clinical applications* - Methods in Molecular Medicine, vol. 15. N. Woodford and A.P. Johnson eds. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey.
- Gibson, J. R., and Owen, R.** (1998) – *Campylobacter* infections. In: *Methods in Molecular Bacteriology: protocols and clinical applications* - Methods in Molecular Medicine, vol. 15 pp. 407-418. N. Woodford and A. Johnson eds. Humana Press Inc. Totowa. New Jersey.
- Gibson, J.R., Shuterland, K. and Owen, R.J.** (1994) – Inhibition of DNase activity in PFGE analysis of DNA from *Campylobacter jejuni*. *Lett. Appl. Microbiol.* **19**: 357-358.
- Gibson, J. R., Slater, E., Xerry, J., Tompkins, D.S. and Owen, R.J.** (1998) – Use of an amplified-fragment length polymorphism technique to fingerprint and differentiate isolates of *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 2580-2585.
- Gibson, J.R., Lorenz, E. and Owen, R.J.** (1997) – Lineages with *Campylobacter jejuni* defined by numerical analysis of pulsed-field gel electrophoretic DNA profiles. *J. Med. Microbiol.* **46**: 157-163.
- Giesendorf, B.A., Goossens, H., Niesters, H.G., Van Belkum, A., Koeken, A., Endtz, H.P., Stegeman, H. and Quint, W. G.** (1994) – Polymerase chain reaction-mediated DNA fingerprinting for epidemiological studies on *Campylobacter* spp.. *J. Med. Microbiol.* **40**: 141 - 147.
- Gill, K.P.** (1983) – Aerotolerant *Campylobacter* strains isolated from a bovine preputial sheath washing. *Vet. Rec.* **112**: 459.
- Gilson, E., Saurrin, W., Perrin, D., Bachellier, S. and Hofnung, M.** (1991) – The BIME family of bacterial highly repetitive sequences. *Res. Microbiol.* **142**: 217-222.
- Gilson, E., Clement, J., M., Brutlag, D. and Hofnung, M.** (1984) – A family of dispersed repetitive, extragenic palindromic DNA sequences in *E.coli*. *EMBO J.* **3**: 1417-1421.
- Gomes, C., Santos, A., Soqui, M. and Cabrita, J.** (1996) – Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolates in an industrial poultry Unit (from production to slaughter) in Portugal. In: *Campylobacters, Helicobacters and related organisms*. Part 2, pp.301-306. Newell, D.G., Ketley, J.M. and Feldman, R.A. Eds. Plenum Press. New York and London.
- González, I, Kudwig, K.A., Richardson, P.T., Park, S.F. and Collins, M.D.** (1997) – Specific identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using a PCR test based on the *CeuE* gene encoding a putative virulence determinant. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 759-763.
- Goodwin, C.S., Armstrong, J.A., Chilvers, T., Peters, M., Collins, M.D., Sly, L., McConnell, W. and Harper, W.E.S.** (1989) – Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**: 397-405.
- Goossens, H., De Mol, P., Coignau, H., Levy, J., Grados, O., Ghysels, G., Innocent, H. and Butzler, J. P.** (1985) - Comparative in vitro activity of Aztreonam, ciprofloxacin norfloxacin, ofloxacin, HR 810 (a new cephalosporin), RU289965 (a new macrolide), and others agents against enteropathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* **27**: 388-392.
- Goossens, H., De Boeck, M., Coignau, H., Vlaes, L., Van den Borre, C. and Butzler, J.P.** (1986) – Modified selective medium for the isolation of *Campylobacter* spp. from feces: comparison with Preston medium, a blood-free medium, and a filtration system. *J. Clin. Microbiol.* **24**: 840-843.
- Grajewski, B.A., Kusek, J.W. and Gelfand, H.M.** (1985) – Development of a bacteriophage typing system for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J. Clin. Microbiol.* **22**: 13-18.
- Grau, F.H.** (1998) – *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in intestinal tract on the carcasses of caves and cattle. *J. Food Prot.*, **51**: 857-861.

- Griffiths, P.L., and Park, R.W.A.** (1990) – *Campylobacter* associated with human diarrheal disease. *J. Applied Bacteriol.* **69**: 281-301.
- Guerry, P., Alm, R.A., Power, M.E., Logan, S.M. and Trust, T.J.** (1991) – The role of two flagellin genes in *Campylobacter* motility. *J. Bacteriol.* **173**: 4757- 4764.
- Guerry, P., Logan, S.M. and Trust, T.J.** (1988) – Genomic rearrangements associated with antigenic variation in *Campylobacter coli*. *J. Bacteriol.* **170**: 316-319.
- Guerry, P., Logan, S.M., Thornton, S. and Trust, T.J.** (1990) – Genomic organization and expression of *Campylobacter* flagellin genes. *J. Bacteriol.* **172**: 1853-1860.
- Hänninen, M. L., Hakkinen, M., and Rautelin, H.** (1999) – Stability of isolated human and chickens *Campylobacter jejuni* genotypes after passages through chick intestine studied by pulsed-field gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2272-2275.
- Hänninen, M.L., Niskanen, M., and Korhonen, L.** (1998) – Water as a reservoir for *Campylobacter jejuni* infection in cows studied by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). *Zentralbl. Veterinarmed. B* **45**: 37-42.
- Harnett, N., McLeod, S., Yong, Y.A., Hewitt, C., Vearncombe, M. and Krishnan, C.** (1995) – Quinolone resistance in clinical strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* **36**: 269-270.
- Harrington, C.S., and On, S.L.** (1999) – Extensive 16S rRNA gene sequence diversity in *Campylobacter hyointestinalis* strains: taxonomic and applied implications. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**: 1171-1175.
- Harrington, C.S., Thomson-Carter, F.M. and Carter, P.E.** (1997) – Evidence for recombination in the flagellin locus of *Campylobacter jejuni* implications for the flagellin gene typing scheme. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 2386-2392.
- Harris N.V. Kimball, T.J., Bennett, P., Johnson, Y., Wakely, D. and Nolan, C.M.** (1987a) – *Campylobacter jejuni* enteritis associated with raw goat's milk. *Am. J. Epidemiol.* **126**: 179 – 186.
- Harris, L.A, Logan, S.M., Guerry, P. and Trust, T.J.** (1987b) – Antigenic variation of *Campylobacter* flagella. *J. Bacteriol.* **169**: 5066-5071.
- Harvey, S. M.** (1980) – Hippurate hydrolysis by *Campylobacter fetus*, *J. Clin. Microbiol.* **11**: 435-437.
- Harvey, S.M. and Greenwood, J.R.** (1983) – Relationship among catalase positive *Campylobacters* determined by deoxyribonucleic acid hybridization. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **33**: 275-284.
- Hasselik, G., Sener, B., and Dikes, K. S.** (1996) - Influence of *Campylobacter jejuni* on Human Neutrophil Chemotaxis. In: *Campylobacters, Helicobacter and related organisms*, Newell, D., Kettley, J. and Feldman, R. eds. Plenum press. New York and London.
- Hayek, L.J. and Cruickshank, J.G.** (1977) – *Campylobacter* enteritis. *British. Med. J.* **2**: 1219.
- Healing, T.D., Greenwood, M.H. and Pearson, A.D.** (1992) – *Campylobacter* and enteritis. *Rev. Med. Microbiol.* **3**: 159-167.
- Hébert, G.A., Hollis, D.G., Weaver, R.E., Lambert, M. A., Blaser, M.J. and Moss, C.W.** (1982) – 30 years of *Campylobacters*: biochemical characteristics and biotyping proposal for *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.* **15**: 1065-1073.
- Hernandez, J., Fayos, A., Ferrus, M.A. and Owen, R.J.** (1995) – Random amplified polymorphic DNA fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from human faeces, seawater, and poultry products. *Res. Microbiol.* **146**: 685-696.
- Higgins, C.F., Ferro-Luizzi Ames, G., Barnes, W.M., Clement, J.M. and Hofnung, M.** (1982) – A novel intercistronic regulatory element of prokaryotic operons. *Nature* **298**: 760-762.
- Hill, B.D., Thomas, R.J. and Mackenzie, A.R.** (1987) - *Campylobacter hyointestinalis*-associated enteritis in Moluccan rusa deer (*Cervus timorensis* subsp. *Moluccensis*). *J. Comp. Pathol.* **97**: 687-694.
- Hilton, A.C., Mortiboy D., Banks J.G. and Penn C.W.** (1997) - RAPD analysis of environmental food and clinical isolates of *Campylobacter* spp. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **18**: 119-124.
- Hirschl, A.M., Wolf, D., Berger, J. and Rotter, M.L.** (1990) - In vitro susceptibility of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated in Austria to erythromycin and ciprofloxacin. *Zentralbl. Bakteriell.* **272**: 443-447.

- Hoffman, P.S., George, H.A., Krieg, N.R. and Smibert, R.M.** (1979) – Studies of the microaerophilic nature of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*. II. Role of exogenous superoxide anions and hydrogen peroxide. *Can. J. Microbiol.* **25**: 8-16.
- Holler, C.** (1988) – Long-term study of occurrence, distribution and reduction of *Campylobacter* sp. in the sewage system and wastewater treatment plant of a big town. *Water Science and Technology*, **20**: 529-531.
- Homma, M., Fujita, H., Yamaguchi, S., and Iino, T.** (1987) – Regions of *Salmonella typhimurium* flagellin essential for its polymerization and excretion. *J. Bacteriol.* **169**: 291-296.
- Hudson, W. R., and Roberts, T. A.** (1982) – The occurrence *Campylobacters* on commercial red-meat carcasses from the abattoir. In *Campylobacter*, Epidemiology, Pathogenesis, and Biochemistry p. 273 Newell, D. G. ed. Lancaster: MPT Press.
- Hulton, C.S.J., Higgins, C.F. and Sharp, P.M.** (1991) - ERIC sequences: A novel family of the repetitive elements of the genome of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol. Microbiol.* **5**: 825-834.
- Humphrey, T.J. and Beckett, P.** (1987) – *Campylobacter jejuni* in dairy cows and raw milk. *Epidemiol. Infect.* **98**: 263-269.
- Hunter, P.R. and Gaston, M.A.** (1988) – Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* **26**: 2465-2466.
- Husmann, M., Feddersen, A., Steitz, A., Freytag, C. and Bhakdi, S.** (1997) - Simultaneous identification of *Campylobacters* and prediction of quinolone resistance by comparative sequence analysis. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 2398-2400.
- Hutchinson DN, Bolton FJ.** (1983) - Is enrichment culture necessary for the isolation of *Campylobacter jejuni* from faeces? *J Clin Pathol.* **36**:1350–1352.
- Huysmans, M.B., Turnridge, J.D. and Williams, J.H.** (1995) – Evaluation of API Campy in comparison with conventional methods for identification of thermophilic *Campylobacters*. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 3345-3346.
- Iino, T.,** (1977) – Genetics of structure and function of bacterial flagella. *Annu. Rev. Genet.* **11**: 161-182.
- Iriarte, M.P., and Owen, R. J.** (1996) – Repetitive and arbitrary primer DNA sequences in PCR-mediated fingerprinting of outbreak and sporadic isolates of *Campylobacter jejuni*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **15**: 17 – 22.
- Jackson, C.J., Fox, A.J., Wareing, D.R., Hutchinson, D.N. and Jones, D.M.** (1996) – The application of genotyping techniques to the epidemiological analysis of *Campylobacter jejuni*. *Epidemiol. Infect.* **117**: 233-244.
- Jackson, C.J., Fox, A.J., Wareing, D.R.A., Sutcliffe, E.M. and Jones, D.M.** (1997) –Genotype analysis of human blood isolates of *Campylobacter jejuni* in England and Wales. *Epidemiol. Infect.* **118**: 81-89.
- Jacobs-Reitsma, W.F., Kan, C.A. and Bolder, N.M.** (1994) - The induction of quinolone resistance in *Campylobacter* bacteria in broilers by quinolone treatment. *Lett. Appl. Microbiol.* **19**: 228-231.
- Jacobs-Reitsma, W.F., van de Giessen, A.W., Bolder, N.M. and Mulder, R.W.** (1995) – Epidemiology of *Campylobacter* spp. at two Dutch broiler farms. *Epidemiol. Infect.* **114**: 413-421.
- Johnsen, G., Kruse, H. and Hofshagen, M.** (2007). Genotyping of thermotolerant *Campylobacter* from poultry slaughterhouse by amplified fragment length polymorphism. *J. Appl. Microbiol.* **103**: 271-279.
- Johnson, W.M. and Lior, H.** (1988) – A new heat-label cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Campylobacter* spp. *Microbiol. Pathol.* **4**: 115 – 126.
- Jones, D.M. and Robinson, D.A.** (1981) – Occupational exposure to *Campylobacter jejuni* infection. *Lancet* **1**: 440-441.
- Jones, F.S., Little, R.B. and Orcutt, M.** (1932) - Continuation of the study of the etiology of infectious diarrhea (winter scours) in cattle. *J. Am. Vet. Med. Ass.* **81**: 610.
- Joys, T.M.** (1976) – Identification of an antibody-binding site in the phase-1 flagellar protein of *Salmonella typhimurium*. *Microbios.* **15**: 221-228.
- Joys, T.M.** (1985) – The covalent structure of the phase-1 flagellar filament protein of *Salmonella typhimurium* and its comparison with the other flagellins. *J. Biol. Chem.* **260**: 15758-15761.
- Joys, T.M.** (1988) – The flagellar filament protein. *Can. J. Microbiol.* **34**: 452-458.

- Kaldor, J. and Speed B: R.** (1984) – Guillain-Barré syndrome and *Campylobacter jejuni*: a serological study. *B.M.J.* **288**: 1867-1870.
- Kapperud G. and Rosef, O.** (1983) - Avian wildlife reservoir of *Campylobacter fetus* subsp. *Jejuni*, *Yersinia* spp., and *Salmonella* spp., in Norway. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 375 – 380.
- Karmali, M.A. and Fleming, P.C.** (1979) – Application of the Fortner principle to isolation of *Campylobacter* from stools. *J. Clin. Microbiol.* **10**: 245-247.
- Karmali, M.A. and Skirrow, M.B.** (1984) – Taxonomy of the genus of *Campylobacter*, in: *Campylobacter infection in man and animals*, pp. 1-2. Butzler, J.P. Ed. CRC Press, Inc; Boca Raton, Florida.
- Karmali, M.A., De Grandis, S. and Fleming, P.C.** (1981) - Antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni* with especial reference to resistance patterns of Canadian isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **19**: 593-597.
- Khalil, K. Lindblom, G.B. Mazhar, K. and Kaijser, B.** (1994), - Flies and water as reservoirs for bacterial enteropathogens in urban and rural areas in and around Lahore, Pakistan. *Epidemiol. Infect.* **113**: 435-444.
- Khalil K., Lindblom, G.B., Mazhar, K., Sjörgren, E. and Kaijser, B.** (1993) – Frequency and enterotoxigenicity of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in domestic animals in Pakistan as compared to Sweden. *J. Trop. Med. Hyg.* **96**: 35-40.
- Kiehlbauch, J.A., Plikaytis, B.D., Swaminathan, B., Cameron, D.N. and Wachsmuth, I.K.** (1991a) – Restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal genes for species identification and subtyping of aerotolerant *Campylobacter* species. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 1670-1678.
- Kiehlbauch, J.A., Brenner, D.J., Nicholson, M.A., Baker, C.N., Patton, C.M., Steigerwalt, A.G. and Wachsmuth, I.K.** (1991b) – *Campylobacter butzleri* sp. nov. isolated from humans and animals with diarrheal illness. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 376-385.
- Kim, N.W. and Chan, V.L.** (1989) – Isolation and characterization of ribosomal RNA genes of *Campylobacter jejuni*. *Curr. Microbiol* **19**: 247-252.
- Kim, N.W., and Chan, V.L.** (1991) – Genomic characterization of *Campylobacter jejuni* by field inversion gel electrophoresis. *Curr. Microbiol* **22**: 123-127.
- Kim, N.W., Gutell, R.R. and Chan, V.L.** (1995) - Complete sequences and organization of the rna operon from *Campylobacter jejuni* TGH9011 (ATCC43431). *Gene* **164**: 101-106.
- Kinana, A.D., Cardinale, E., Tall, F., Bahsoun, I., Sire, J.-M., Garin, B., Breurec, S., Saad-Bouth Boye, C. and Perrier-Gros-Claude, J.-D.** (2006). Genetic diversity and quinolone resistance in *Campylobacter jejuni* isolates from poultry in Senegal. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 3309-3313.
- Kinana, A.D., Cardinale, E., Bahsoun, I., Tall, F., Sire, J.-M., Breurec, S., Garin, B., Saad-Bouth Boye, C. and Perrier-Gros-Claude, J.-D.** (2007). *Campylobacter coli* isolates derived from chickens in Senegal: Diversity, genetic exchange with *Campylobacter jejuni* and quinolone resistance. *Res. Microbiol.* **158**: 138-142.
- King, E.O.** (1957) – Human infection with *Vibrio fetus* and closely related *Vibrio*. *J. Infect. Dis.* **101**: 119-128.
- King, E.O.** (1962) – The laboratory recognition of *Vibrio fetus* and closely related *Vibrio* isolated from cases of human vibriosis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **98**: 700-711.
- Klena, J.** (2001) – A survey of phenotypic and genetic methods used to identify and differentiate thermotolerant *Campylobacter* spp. strains. In: A report to the Ministry of health. New Zealand. <http://www.moh.govt.nz>
- Klipstein, F.A., Engert, R.F., Short, H. and Schenk, E.A.** (1985). Pathogenic properties of *Campylobacter jejuni*: assay and correlation with clinical manifestations. *Infect. Immun.* **50**: 43-49.
- Knill, M.J., Suckling, W.G. and Pearson, A.D.** (1982) – *Campylobacters* from water, In: *Campylobacter, Epidemiology, Pathogenesis and Biochemistry*. Cap. 105, pp. 281-285. Newell, D.G. Ed. M.T.P. Press Ltd. Boston.
- Koeleman, J.G.M., Stoof, J., Biesmans, D.J., Savelkoul, P.H.M. and Vandenbrouke-Grauls, C.M.J.E.** (1998) – Comparison of amplified ribosomal DNA restriction analysis, random amplified polymorphic DNA analysis, and amplified fragment length polymorphism fingerprinting for identification of *Acinetobacter* genomic species and typing of *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 2522-2529.

- Koenraad, P.M., Ayling, R., Hazeleger, W.C., Rombouts, F.M. and Newell, D.G. (1995) – The speciation and subtyping of *Campylobacter* isolates from sewage plants and water from a connected poultry abattoir using molecular techniques. *Epidemiol. Infect.* **115**: 485-494.
- Komeda, Y. (1986) – Transcriptional control of flagellar genes in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **168**: 1315-1318.
- Korhonen, L.K. and Martikainen, P.J. (1991) – Comparison of the survival of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in culturable form in surface water. *Can. J. Microbiol.* **37**: 530-533.
- Korolik, V., Coloe, P.J. and Krishnapillai, V. (1988) – A specific DNA probe for identification of *Campylobacter jejuni*. *J. Gen Microbiol.* **134**: 521-529.
- Kutsukake, K., Ohya, Y. and Iino, T. (1990) Transcriptional analysis of flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **172**: 741-747.
- Kuwajima, G. (1988) – Flagellin domain that affects H antigenicity of *Escherichia coli*. *J. of Bacteriol.* **170**: 485-488.
- Kuwajima, G., Asaka, J., Fujiwara, T., Fujiwara, T., Node, K. and Kondo, E. (1986) – Nucleotide sequence of the *hag* gene encoding flagellin of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **168**: 1479-1483.
- Kwon, D.H., El-Zaatari, F.A., Woo, J.S., Perng, C.L., Graham, D.Y. and Go, M.F. (1998) – Rep-PCR fragment as biomarkers for differentiating gastroduodenal disease-specific *Helicobacter pylori* strains. *Dig. Dis. Sci.* **43**: 980-987.
- Lambert, M.A., Patton, C.M., Barrett, T.J. and Moss, C.W. (1987) – Differentiation of *Campylobacter* and *Campylobacter*-like organisms by cellular fatty acid composition. *J. Clin. Microbiol.* **25**: 706-713.
- Lawson, A.J., On, S.L.W., Logan, J.M.J. and Stanley, J. (2001) – *Campylobacter hominis* sp. nov., from the human gastrointestinal tract. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 651-660.
- Lawson, A.J., Shafi, M.S., Parthak, K. and Stanley, J. (1998) – Detection of *Campylobacter* in gastroenteritis: comparison of direct PCR assay of faecal samples with selective culture. *Epidemiol. Infect.* **121**: 547-553.
- Lawson, G.H.K., Leaver, J.L., Pettigrew, G.W. and Rowland, A.C. (1981) Some features of *Campylobacter sputorum* subsp. *mucosalis* subsp. Nov., nom. rev. and their taxonomic significance. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **31**: 385 – 391.
- Lee, A., O'Rourke, J.L., Barrington, P.J. and Trust, T.J. (1986) – Mucus colonization as determinant of pathogenicity in intestinal infection by *Campylobacter jejuni*: a mouse cecal model. *Infect. Immun.*, **51**: 536-546.
- Lee, R. B. Hassane D, C., Cottle, D. L., Pickett, C. L. (2003) - Interactions of *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin subunits CdtA and CdtC with HeLa cells. *Infect. Immunol.* **71**: 4883 – 4890.
- Lekowska-Kochaniak A, Rozynek E, Popowski J (1996) - Antibiotic resistance of *Campylobacter jejuni* with reference to plasmid profiles of clinical and chicken isolates. *Acta Microbiol. Pol.* **45**: 249–259.
- Lentzsch, P., Riexneuwöhner, B., Wieler, L.H., Hotzel, H. and Moser, I. (2004) – High-resolution genotyping of *Campylobacter upsaliensis* strains originating from three continents. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 3441-3448.
- Levy, A.J. (1946) – A gastroenteritis outbreak probably due to a bovine strain of vibrio. *Yale J. Biol. Med.* **18**: 243-248.
- Levy, S.B. (1988) – Tetracyclines resistance determinants are widespread. *ASM News*, **54**: 418-421.
- Li, C.C., Chiu, C.H., Wu, J.L., Huang, Y.-C. and Lin, T.-Y., (1998) – Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter jejuni* and *coli* by using E-test in Taiwan. *Scand. J. Infect. Dis.* **30**: 39-42.
- Lindenstruth, R.W. and Ward, B.Q. (1948) – Viability of *Vibrio fetus* in hay, soil manure. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **113**:163.
- Linton, D., Lawson, A.J., Owen, R.J. and Stanley, J. (1997) – PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. *J. Clin. Microbiol.* **35**(10): 2568-2572.
- Lior, H. (1984) – New extended biotyping scheme for *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and “*Campylobacter lariidis*”. *J.Clin. Microbiol.* **20**(4): 636-640.
- Lior, H., Woodward, D.L., Edgar, J.A., Loroche, L.J. and Gill, P. (1982) – Serotyping of *Campylobacter jejuni* by slide agglutination based on heat-labile antigenic factors. *J. Clin. Microbiol.* **15** : 761-768.

- Litrup, E., Torpdahl, M. and Nielsen, E.M.** (2007) – Multilocus sequence typing performed on *Campylobacter coli* isolates from humans, broilers, pigs and cattle originating in Denmark. *J. Appl. Microbiol.* **103**: 210-218.
- Logan, S.M. and Trust, T.J.** (1983) – Molecular identification of surface proteins antigens of *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.* **42**: 675-682.
- Logan, S.M., Guerry, P., Rollins, D.M., Burr, D.H. and Trust, T.J.** (1989) – In vivo antigenic variation of *Campylobacter* flagellin. *Infect. Immun.* **57**: 2583-2585.
- Logan, E.F., Neill, S.D. and Mackie, D.P.** (1982) – Mastitis in dairy cows associated with an aerotolerant *Campylobacter*. *Vet. Rec.* **110**: 229-230.
- Logan, J.M.J., Burnens, A., Linton D., Lawson, A.J. and Stanley, J.** (2000) – *Campylobacter lanienae* sp. nov., a new species isolated from workers in an abattoir. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**, 865–872.
- Lorenz, E., Lastovica, A. and Owen, R.J.** (1998) – Subtyping of *Campylobacter jejuni* Penner serotypes 9, 38 and 63 from human infections, animals and water by pulsed field gel electrophoresis and flagellin gene analysis. *Lett. Appl. Microbiol.* **26**: 179-182.
- Lowry, D.B., Pearce, J.H. and Kennedy, J.F.** (1974) – The effects of osmotic variation upon the growth of *Vibrio fetus*. *J. Gen. Microbiol.* **80**: 541-548.
- Lübeck, P.S., Cook, N., Wagner, M., Fach, P. and Hoorfar, J.** (2003) - Toward an international standard for PCR-based detection of food-borne thermotolerant *Campylobacters*: validation in a multicenter collaborative trial. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 5670-5672.
- Luechtefeld, N.A., Blaser, M.J., Reller, L.B. and Wang, W.L.** (1980) – Isolation of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* from migratory waterfowl. *J. Clin. Microbiol.* **12**: 406-408.
- Macnab, R. M.** (1988) – *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology. pp. 70-83. Ingraham, J.L. and Nedhardt, F.C. Eds ASM. Washington, DC.
- Makino, K., Kim S.K., Shinagawa, H., Amemura, M. and Nakata, A.** (1991) – Molecular analysis of the cryptic and functional *phn* operons for phosphonate use in *Escherichia coli* K12. *J. Bacteriol.* **173**: 2665-2672.
- Mandal B.K., De Mol, P. and Butzler, J.P.** (1984) - Clinical aspects of *Campylobacter* infections in humans, in: *Campylobacter infection in Man and Animals*, 2nd. Ed. cap. 2, pp. 21 – 31. CRC press, E.U.A.
- Marooka, T., Umeda, A. and Amako, K.** (1985) – Motility as an intestinal colonization factor for *Campylobacter jejuni*. *J. Gen. Microbiol.* **131**: 1973-1980.
- Marshall, B.J. and Goodwin, C.S.** (1987) – Revised nomenclature of *Campylobacter pyloridis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**: 68.
- Marshall, B.J. and Warren, J.R.** (1984) – Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet.* **1**: 1311-1315.
- McFadyean, J. and Stockman, S.** (1913) – Report of the Departmental Committee Appointed by Board Agriculture and Fisheries to Inquire into Epizootic Abortion. Appendix to Part III, 1-64. Her Majesty's Stationery Office. London.
- McLung, C.R. and Patriquin, D.G.** (1980) – Isolation of nitrogen-fixing *Campylobacter* species from the roots of *Spartina alterniflora*, Loisel. *Can. J. Microbiol.* **26**: 881-886.
- McLung, C.R., Patriquin, D.G. and Davis, R.E.** (1983) *Campylobacter nitrofigilis* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with roots of *Spartina alterniflora* Loisel. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **33**: 605-612.
- Mead, G.C. and Hinton, M.H.** (1989) – Behaviour of *Campylobacter* in production processing and storage of poultry. in: Proceedings Hohenheimor Geflügelsymposium pp.48-57.
- Meinersmann, R.** (1996) – Multiple homology analysis of the *flaA* gene of *Campylobacter jejuni*. In: *Campylobacters, Helicobacters, and Related organisms*. pp.591-2. Newell, D.G., Ketley, J.M., and Feldman, R.A. Eds. Plenum Press, New York.
- Meinersmann, R.J., Helsel, L.O., Fields, P.I. and Hiett, K.L.** (1997) – Discrimination of *Campylobacter jejuni* isolates by *flaA* gene sequencing. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 2810-2814.
- Mentzing, L.O.** (1981) – Waterborne outbreaks of *Campylobacter* enteritis in central Sweden. *Lancet* **2**: 352-354.

- Meyer, W., Mitchell, T. G., Freedman, E. Z., and Vilgalys, R.** (1993) - Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in PCR to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 2274-2280.
- Mills, S.D., Congi, R.V., Hennessy, J.N. and Penner, J.L.** (1991) – Evaluation of simplified procedure for serotyping *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* which is based on O antigen. *J. Clin. Microbiol.* **29**(10): 2093-2098.
- Mirelis, B., Miro, E., Navarro, F., Ogalla, C.A., Bonal, J., and Prats, G.** (1993) - Increased resistance to quinolone in Catalonia, Spain. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **16**: 137-139.
- Misawa, N., Allos, B.M. and Blazer, M.J.** (1998) – Differentiation of *Campylobacter jejuni* serotype O19 strains from non-O19 strains by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **36**(12): 3567-3573.
- Moles, B., Santacruz, C., Gimeno, C. and Remacha, M.A.** (1992) - Resistência de *Campylobacter jejuni* em Zaragoza. *Rev. Esp. Quimioter.* **5**: 171-172.
- Moran, A. P. and Upton, M. E.** (1987) – Factors affecting production of coccoid forms by *Campylobacter jejuni* on solid media during incubation. *J. Appl. Bacteriol.* **62**: 527-537.
- Moser, I., Riexneuwöhner, B., Lentzsch, P., Schwerk, P. and Wieler, L.H.** (2001). Genomic heterogeneity and O-antigenic diversity of *Campylobacter upsaliensis* and *C. helveticus* strains isolated from dogs and cats in Germany. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 2548-2557.
- Moss, C.W., Kai, A., Lambert, M.A. and Patton, C.** (1983) – Isoprenoid quinone content and cellular fatty acid composition of *Campylobacter* species. *J. Clin. Microbiol.* **19**: 772-776.
- Mouwens, D. J. M., Weijtens, M. J. N. M., Capita, R., Alonso-Calleja, C., and Prieto, M.** (2005) - Discrimination of enterobacterial repetitive consensus PCR types of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* by Fourier-transformed infrared spectroscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 4318-4324.
- Murphy G.S. Jr., Echeverria P., Jackson, L.R., Arness, M.K., LeBron, C. and Pitarangsi, C.** (1996) – Ciprofloxacin- and Azithromycin-resistant *Campylobacter* causing traveller's diarrhea in U.S. troops deployed to Thailand in 1994. *Clin. Infect. Dis.* **22**: 868-869.
- Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Kobayashi, G.S. and Pfaller, M.A** (1998) – *Campylobacter* and *Helicobacter*. In: *Medical Microbiology*, 3rd Ed., cap. 31, pp. 251-257. Mosby, St. Louis – Missouri. E.U.A.
- Murray, R.G.E., Brenner, D.J., Colwell, R.R., De Vos, P., Goodfellow, M., Grimont, P.A.D., Pfenning, N., Stackebrandt, E. and Zavarzin, G.A.** (1990) – Report of the ad hoc committee on approaches to taxonomy within the proteobacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **40**: 213- 215.
- Nachamkin, I.** (1994) - Antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* to ciprofloxacin, erythromycin and tetracycline from 1982-1992. *Med. Microbiol. Lett.* **3**: 300-305.
- Nachamkin, I., Bohachick, K. and Patton, C.M.** (1993) – Flagellin gene typing of *Campylobacter jejuni* by restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 1531-1536.
- Nachamkin, I., Ung, H. and Patton, C.M.** (1996) – Analysis of HL and O serotypes of *Campylobacter* strains by the flagellin gene typing system. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 277-281.
- Nair, G.B., Sarkar, R.K., Chowdhury, S. and Pal, S.C.** (1985) – *Campylobacter* infection in domestic dogs. *Vet. Rec.* **116**: 237 – 238.
- Namba, K., Yamashita, I. and Vonderviszt, F.** (1989) – Structure of the core and central channel of bacterial flagella. *Nature* **342**: 648-654.
- NCCLS** (1979) - Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Villanova, PA. USA. 1979.
- Neill, S.D., Campbell, J.N. and O'Brien, J.J.** (1985a) – Eggs penetration by *Campylobacter jejuni*. *Avian Pathol.* **14**: 313-320.
- Neill, S.D., Campbell, J.N., O'Brien J.J., Weatherup, S.T. and Ellis, W. A.** (1985b) – Taxonomic position of *Campylobacter cryaerophila* sp. nov. *Inst. J. Syst. Bacteriol.* **35**: 342-356.
- Newbury, S.F., Smith, N.H., Robinson, E.C., Hiles, I.D. and Higgins, C.F.** (1987) – Stabilization of translationally active mRNA by prokaryotic REP sequences. *Cell*, **48**: 297-310.
- Newell, D.G.** (1986) - Monoclonal antibodies directed against the flagella of *Campylobacter jejuni*: production, characterization and lack of effect on the colonization of infant mice. *J. Hyg (Lond)*. **96**: 131-141.

- Newell, D.G., McBride, H. and Dolby, J.M.** (1985) – Investigations on the role of flagella in the colonization of infant mice with *Campylobacter jejuni* and attachment of *Campylobacter jejuni* to human epithelial cell lines. *J. Hyg. (Lond)*. **95**: 217-227.
- Ng, L.K., Stilles, M.E. and Taylor, D.E.** (1987) - DNA probe for identification of Tetracycline genes in *Campylobacter* species isolated from swine and cattle. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**: 1669-1674.
- Nicholson, M.A. and Patton, C.M.** (1993) – Application of Lior biotyping by use of genetically identified *Campylobacter* strains. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 3348 – 3350.
- Nielsen, E.M., Engberg, J., Fussing, V., Petersen, L., Brogren, C-H., On, S.L.W.** (2000) - Evaluation of phenotypic and genotypic methods for subtyping *Campylobacter jejuni* isolates from humans, poultry, and cattle. *J. Clin. Microbiol.* **38** (10): 3800-3810.
- Norkrans, G. and Svedhem, A.** (1982) – Epidemiological aspects of *Campylobacter jejuni*. *J. Hyg.* **89**:163 –170.
- Nuijten, P.J.M., Bleumink-Pluym, N. M., Gaastra, W. and van der Zeijst, B.A.** (1989) – Flagellin expression in *Campylobacter jejuni* is regulated at the transcriptional level. *Infect. Immun.* **57**: 1084-1088.
- Nuijten, P.J., van Asten, F.J., Gaastra, W. and van der Zeijst, B.A.** (1990) - Structural and functional analysis of two *Campylobacter jejuni* flagellin genes. *J. Biological Chemistry* **265**: 17798-17804.
- Ogden, I D., MacRae, M., Johnston, M., Strachan, N. J. C., Cody, A. J., Dingle, K. E., and Newell, D. G.** (2007) – Use of multilocus sequence typing to investigate the association between the presence of *Campylobacter* spp. in broiler drinking water and *Campylobacter* colonization in broilers. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 5125-5129.
- Olive, D. M. and Bean, P.** (1999) – Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J. Clin. Microbiol.* **37** (6): 1661-1669.
- Olive, D.M., Johnny, M. and Sethi, S.K.** (1990) Use of an alkaline phosphatase-labeled synthetic oligonucleotide probe for detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J. clin. Microbiol.* **28**: 1565-1569.
- Olsson-Liljequist, B. and Mollby, R.,** (1990) - "In vitro" activity of norfloxacin and other antibacterial agents against gastrointestinal pathogens isolated in Sweden. *APMIS.* **98**: 150-155.
- On, S.L.W.** (1996) – Identification methods for campylobacters, helicobacters, and related organisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **9**: 405-422.
- On, S.L.W.** (1998) – In vitro genotypic variation of *Campylobacter coli* documented by pulsed field gel electrophoretic DNA profiling: implications for epidemiological studies. *FEMS Microbiol. Lett.* **165**: 341-346.
- On, S.L.W. and Jordan, P.J.** (2003). Evaluation of 11 PCR assays for species-level identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J. Clin. Microbiol.* **41**:330-336.
- On, S.L.W, Atabay, H.I., Corry, J.E.L., Harrington, C.S., and Vandamme, P.** (1998) – Emended description of *Campylobacter sputorum* and revision of its infrasubspecific (biovar) divisions, including *C. sputorum* biovar *paraureolyticus*, a urease-producing variant from cattle and humans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* , **48**: 195-206.
- Ono, K. Kurazono, T., Niwa, H., Itoh, K.** (2003) - Comparison of three methods for epidemiological typing of *Campylobacter jejuni* and *c. coli*. *Curr. Microbiol.* **47**(5): 364-371
- Oosterom, J., den Uyl, C.H., Bänffer, J.R. and Huisman, J.** (1984) – Epidemiological investigations on *Campylobacter jejuni* in households with a primary infection. *J. Hyg. (Lond)*. **93**: 325 – 332.
- Owen, R.J.** (1989) – Chromosomal DNA fingerprinting - a new method of species and strains identification applicable to microbial pathogens. *J. Med. Microbiol.* **30**: 89-99.
- Owen, R.J. and Dawson, C.** (1986) – DNA base compositions and base sequence relatedness of atypical *Campylobacter jejuni* strains from clinical material. *FEMS Microbiol. Lett.* **35**: 283-287.
- Owen, R.J., Costas, M. and Dawson, C.** (1989) – Application of different chromosomal DNA restriction digest fingerprints to specific and subspecific identification of *Campylobacter* isolates. *J. Clin. Microbiol.* **27**: 2338-2343.

- Owen, R.J. and Loeton, S. (1999) – Restriction fragment length polymorphism analysis of the *flaA* gene of *Campylobacter jejuni* for subtyping human, animal, and poultry isolates. *FEMS. Microbiol. Lett.* **176**: 345-350.
- Owen, R.J., Hernandez, J. and Bolton, F. (1990) – DNA restriction digest and ribosomal DNA gene patterns of *Campylobacter jejuni*: a comparative with bio-, sero-, and bacteriophage-types of United Kingdom outbreaks strains. *Epidemiol. Infect.* **105**: 265-275.
- Owen, R.J., Lorenz, E. and Gibson J. (1997) – Application of the Mast resistotyping scheme to *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J. Med. Microbiol.* **46**: 34-38.
- Owen, R.J., Fayos, A., Hernandez, J. and Lastovica, A. (1993) – PCR-based restriction fragment length polymorphism analysis of DNA sequence diversity of flagellin genes of *Campylobacter jejuni* and allied species. *Mol. Cell. Probes* **7**: 471-480.
- Owen, R.J., Fitzgerald, C., Sutherland K., and Borman, P. (1994) – Flagellin gene polymorphism analysis of *Campylobacter jejuni* infecting man and other hosts comparison with biotyping and somatic antigen serotyping. *Epidemiol. Infect.* **113**: 221-234.
- Oyofe, B.A. and Rollins, D.M. (1993) – Efficacy of filter types for detecting *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in environmental water samples by polymerase chain reaction. *Appl. Clin. Microbiol.* **59**(12): 4090-4095.
- Oyofe, B. A., Thornton, S. A., Burr, D. H., Trust, T. J., Pavloskis, O. R., and Guerry, P. (1992) – Specific detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 2613-2619.
- Palmer, S.R., Gully, P.R., White, J.M., Pearson, A.D., Suckling, W.G., Jones, D.M., Rawes, J.C., Penner, J.L. (1983): - Water-borne outbreak of *Campylobacter gastroenteritis*. *Lancet* **1**: 287-280.
- Park, R.W.A., Griffith, P.L. and Moreno, G.S. (1991) – Sources and survival of campylobacters: relevance to enteritis and the food industry. *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser.* **70**: 97S-106S.
- Patton, C.M., Wachsmuth, I.K., Evins, G.M., Kiehlauch, J.A., Plikaytis, B.D., Troup, N., Tompkins, L. and Lior, H. (1991) – Evaluation of 10 methods to distinguish epidemic associated-*Campylobacter* strains. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 680-688.
- Pearson, A.D., Lior, H., Hood, A.M. and Hustin, P. (1985) – Longitudinal study of the occurrence biotyping and serogroup of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolations from environmental sources in Southern England between 1977 and 1985. In *Campylobacter* III, pp. 279 -280. Pearson, A.D., Skirrow, M.B., Lior, H. and Bowe, B. eds. London. Public Health Laboratory Service.
- Penner, J.L. (1988) – The genus *Campylobacter*: a decade of progress. *Clin. Microbiol. Rev.* **1**: 157-172.
- Penner, J.L. and Hennessy, J.N. (1980) – Passive hemagglutination technique for serotyping *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* on the basis of soluble heat-stable antigens. *J. Clin. Microbiol.* **12**: 732-737.
- Penner, J.L., Hennessy, J.N. and Congi, R.V. (1983) – Serotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* on the basis of thermostable antigens. *Eur. J. Clin. Microbiol.* **2**: 378-383.
- Perkins-Jones, K., Holman, R.L. and Frost, F. (1982) – Waterborne transmission of *Campylobacter*. *West J. Med.* **137**: 339.
- Pickett, C.L. and Whitehouse, C.A. (1999) – The cytolethal distending toxin family. *Trends in Microbiol.* **7**: 292 – 297.
- Pickett, C.L., Pesci, E.C., Cottle, D.L., Russell, G., Erden, A.N. and Zeytin, H. (1996) - Prevalence of cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* and relatedness of *Campylobacter* spp. *cdtB* gene. *Infect and Immunol.* **64**: 2070 – 2078.
- Piddock, L.J. (1995) - Quinolone resistance and *Campylobacter* spp. *J. Antimicrob. Chemother.* **36**: 891-898.
- Pitcher, D.G., Saunders, N.A. and Owen, R.J. (1989) – Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett. Appl. Microbiol.* **8**: 151-156.
- Pleier, E. and Schmitt, R. (1989) – Identification and sequence analysis of two related flagellin gene in *Rhizobium melilotis*. *J. Bacteriol.* **171**: 1467-1475.
- Potter, M.E., Blaser, M.J., Sikes, R.K., Kaufmann, A.F. and Wells, J.G. (1983) – Human *Campylobacter* infection associated with certified raw milk. *Am. J. Epidemiol.* **117**: 475 - 483.

- Prescott, J.F. and Munroe, D.L.** (1982) - *Campylobacter jejuni* enteritis in man and domestic animals. *J. Am- Vet. Med. Assoc.* **181**: 1524-1530.
- Prévôt, A.R.** (1940) – Études de systématique bactérienne V. Essai de classification des vibrions anaérobies. *Ann. Inst. Pasteur*, **64** : 117-125.
- Priest, F. and Austin, B.** (1993) – Chemosystematics and molecular biology I: Nucleic acid analyses In: Modern bacterial taxonomy. 2^a Ed. p. 50. Chapman & Hall. London. U.K.
- Ralph D. and McClland, M.** (1998) – Arbitrarily primed PCR methods for bacterial diseases. In: Methods in Molecular Medicine, vol. 15: *Molecular Bacteriology: Protocols and clinical Applications* p. 96. N. Woodford and A P. Johnson Eds. Humana Press Inc., Totowa, N. J.
- Razi, M.H., Park, R.W., and Skirrow, M.B.** (1980) – Two new tests for differentiating between strains of *Campylobacters*. *J. Appl. Bacteriol.* **50**: 55-57.
- Regimbeau, C., Salvat, G. Colin, P. and Ermel, G.** (1998) – Development of a multiplex PCR gene fingerprinting method using *gyrA* and *pflA* polymorphisms to identify genotypic relatedness within *Campylobacter jejuni* species. *J. Appl. Microbiol.* **85**: 829-838.
- Reina, J.** (1993) - Detección de alto grado de resistencia a fluoroquinolonas en cepas de *Campylobacter jejuni*. Descripción de los mutantes tipo 1 y 2. *Revista Española de Quimioterapia* **6**: 314-318.
- Reina, J. Ros, M.J. and Serra, A.** (1994) - Susceptibilities to 10 antimicrobial agents of 1,220 *Campylobacter* strains isolated from 1987 to 1993 from faeces of pediatric patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**: 2917-2920.
- Reina, J., Ros, M.J. and Fernandez-Baca, V.** (1995) - Resistance to erythromycin in Fluoroquinolone-resistant *Campylobacter jejuni* strains isolated from human faeces. *J. Antimicrob. Chemother.* **35**: 351-352.
- Ribeiro, C.D., Thomas, M.T., Kembrey, D., Magee, J.T. and North, Z.** (1996) – Resistotyping of campylobacters: fulfilling a need. *Epidemiol. Infect.* **116**: 169-175.
- Ridley, A. M.** (1998) – Genomic fingerprinting by application of rep-PCR. In: *Methods in Molecular Medicine, Vol 15: Molecular Bacteriology: Protocols and Clinical Applications*, pp. 103-115. N. Woodford and A. P. Johnson Eds. Humana Press: Totowa, NJ.
- Ritchie, A.E., Keeler, R.F. and Bryner, J.H.** (1966) – Anatomical features of *Vibrio fetus*: electronic microscopic survey. *J. Gen. Microbiol.* **43**: 427-438.
- Robinson, D.A.** (1981) – Infective dose of *Campylobacter jejuni* in milk. *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)* **282**: 1584.
- Robinson, D.A. and Jones, D.M.** (1981) – Milk-borne *Campylobacter* infection. *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)* **282**: 1374 – 1376.
- Romaniuk, P.J. and Trust, T.J.** (1987) – Identification of *Campylobacter* species by southern hybridization of genomic DNA using an oligonucleotide probe for 16S rRNA genes. *FEMS Microbiol. Lett.* **43**: 331-335.
- Romaniuk, P.J., Zoltowska, B., Trust, T.J., Lane, D.J., Olsen, G.J., Pace, N.R. and Stall, D.A.** (1987) – *Campylobacter pylori*, the spiral bacterium associated with human gastritis, is not a true *Campylobacter* sp. *J. Bacteriol.* **169**: 2137-2141.
- Roop, R.M. 2nd, Smibert, R.M., and Krieg, N.R.** (1984). - Improved biotyping schemes for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J. Clin. Microbiol.* **20**: 990-992.
- Roop, R.M. II, Smibert, R.M., Johnson, J.L. and Krieg, N. R.** (1985a) – *Campylobacter mucosalis* (Lawson, Leaver, Pettigrew, and Rowland, 1981) comb. nov. Emended description. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **35**: 189 –192.
- Rosef, O., Kapperud, G. and Skjerve, E.** (1987) – Comparison of media and filtration procedures for qualitative recovery of thermotolerant *Campylobacter* spp. from naturally contaminated surface water. *Int. J. Food Microbiol.* **5**: 29-39.
- Rosef, O., Gondrosen, B., Kapperud, G. and Underdal, B.** (1983) – Isolation and characterization of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from domestic and wild mammals in Norway. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 855-859.
- Ruiz-Palacios, G.M., Torres, J., Torres, N.I., Escamilla, E., Ruiz-Palacios, B.R. and Tamayo, J.** (1983). Cholera-like enterotoxin produced by *Campylobacter jejuni*. Characterisation and clinical significance. *Lancet* **2**: 250-253.

- Ryskov, A.P., Jincharazde, A.G., Prosnjak, M.I., Ivanov, P.L. and Limbroška S.A.** (1988) - M13 phage as a universal marker for DNA fingerprinting of animal, plants and microorganisms. *FEBS Lett.* **233**: 388-392.
- Sáenz, Y., Zarazaga, M., Lantero, M., Gastañares, M.J., Baguero, F. and Torres, C.** (2000) - Antibiotic resistance in *Campylobacter* strains isolated from animals, foods, and humans in Spain in 1997-1998. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 267-271.
- Sagara, H., Mochizuki, A., Okamura, N. and Nakaya, R.** (1987) - Antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* with special reference to plasmid profiles of Japanese clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**: 713-719.
- Sails, A.D., Wareing, D.R., Bolton, F.J., Fox, A.J. and Curry, A.** (1998) - Characterization of 16 *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* typing bacteriophages. *J. Med. Microbiol.* **47**: 123-128
- Salama, S.M., Bolton, F.J. and Hutchinson, D.N.** (1990) - Application of new phagetyping scheme to *Campylobacter* isolated during outbreaks. *Epidemiol. Infect.* **104**: 405-411.
- Sambrook, J., Fritsh, E.F. and Maniatis, T.** (1989) - *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* (2nd Ed.) Cold Spring Harbor, Ny: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sánchez, R., Fernández-Baca, V., Díaz, M.D., Muñoz, P., Rodríguez-Créixems, M. and Bouza, E.** (1994) - Evolution of susceptibilities of *Campylobacter* spp. to quinolones and macrolides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**: 1879-1882.
- Scates, P., Moran, L. and Madden, R.H.** (2003) - Effect of incubation temperature on isolation of *Campylobacter jejuni* genotypes from foodstuffs enriched in Preston broth. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 4658-4661.
- Sebald, M., and Véron, M.** (1963) - Teneur en bases de l'ADN et classification des vibrions. *Ann. Inst. Pasteur.* **105** : 897-910.
- Sharples, G.J. and Lloyd, R.G.** (1990) - A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. *Nucleic Acids Res.* **18**: 6503-6508.
- Shyamala, V., Schneider, E. and Ames, G.F.** (1990) - Tandem chromosomal duplications: role of REP sequences in the recombination event at the join-point. *EMBO J.* **9**: 939-946.
- Sjögren, E. and Kaijser, B.** (1989) - Serotyping studies of *Campylobacter* from naturally colonized chickens. *Epidemiol. Infect.* **102**: 215-219.
- Sjögren, E., Kaijser, B. and Werner, M.** (1992) - Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated in Sweden: a 10-year follow-up report. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**: 2847-2849.
- Skirrow, M.B.** (1977) - *Campylobacter* enteritis: a "new" disease. *Br. Med. J.* **2**: 9-11.
- Skirrow, M.B.** (1981a) - An outbreak of presumptive food-borne *Campylobacter* enteritis. *J. Infect.* **3**: 234-236.
- Skirrow, M.B.** (1981b) - *Campylobacter* enteritis in dogs: a "new" zoonosis. *Vet. Res. Comm.* **5**: 13-19.
- Skirrow M.B. and Benjamin, J.,** (1980a) - Differentiation of enteropathogenic *Campylobacter*. *J. Clin. Pathol.* **33**: 1122.
- Skirrow, M.B. and Benjamim, J.** (1980b) - "1001" *Campylobacters*; cultural characteristics of intestinal campylobacters from man and animals. *J. Hyg. (Lond).* **85**: 427 - 442.
- Skirrow M.B., and Blaser, M.J.** (1992) - *Clinical and epidemiologic considerations in Campylobacter jejuni: current status and future trends*, pp 3-8. Nachamkin, I., Blaser, M.J. and Thomkins, L.S. Eds. ASM, Washington, DC.
- Smibert, R. M.** (1969) - *Vibrio fetus* var. *intestinalis* isolated from intestinal content of birds. *Am. J. Vet. Res.* **30**: 1437-1442.
- Smibert, R.M.** (1974) - Genus II. *Campylobacter*, p. 207-212. In R. E. Buchanan and N. E. Gibbon (ed), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1. The William and Wilkins Co., Baltimore.
- Smibert, R. M.** (1978) - The genus *Campylobacter*. *Annu. Rev. Microbiol.* **32**: 673-709.
- Smith, K.E., Besser, J.M., Hedberg, C.W., Leano, F.T., Bender, J.B., Wiclund, J.H., Johnson, B.P., Moore, K.A., Osterholm, M.T.** (1998) - Quinolone-Resistant *Campylobacter jejuni* infections in Minnesota, 1992-1998. *N. Engl. J Med.* **340** (20): 1581-1582.
- Snelling, W.J., Matsuda, M., Moore, J.E. and Dooley, J.S.G.** (2005) - Under the microscope: *Campylobacter jejuni*. *Lett. Appl. Microbiol.* **41**: 297-302.

- Speelman, P. and Struelens, M.J.** (1984) – *Campylobacter jejuni* travellers' diarrhea: In: *Campylobacter infection in man and animals* Cap. 13, pp 33 - 38. Butzler, J.P.M.D. ed. CRC Press, Inc, Boca-Raton, Florida, 1984.
- Stackebrandt, E., Murray, R.G.E. and Trueper, H.G.** (1988) – Proteobacteria classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the "purple bacteria and their relatives". *Int. J. Syst. Bacteriol.* **3**: 321-325.
- Stanley, J. Burnens, A. P., Linton D., On, S. L., Costa, M. And Owen, R. J.** (1992) - *Campylobacter helveticus* sp. nov., a new thermophilic species from domestic animals: characterization, and cloning of a species-specific DNA probe. *J. Gen Microbiol.* **138**: 2293-2303.
- Stanley, J. Jones, C., Burnens, A. and Owen R. J.** (1994) - Distinct genotypes of human and canine isolates of *Campylobacter upsaliensis* determined by 16S rRNA gene typing and plasmid profiling. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 1788 - 1794.
- Steele, T.W., and Owen, R.J.** (1988) - *Campylobacter jejuni* subsp. *doylei* (subsp. nov.), a subspecies of nitrate-negative *Campylobacters* isolated from human clinical specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**: 316-318.
- Steele, T.W., Lanser, J.A. and Sangster, N.** (1985) - Nitrate-negative *Campylobacter*-like organisms. *Lancet.* **1**: 394.
- Stern, M. J., Ames, G.T.L., Smith, N. H., Robinson, E. C. and Higgins, C. F.** (1984) – Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. *Cell*, **37**: 1015-1026.
- Stern, M. J., Prossnitz, E. and Ames, G. F-L.** (1988) – Role of intercistronic region in post-transcriptional control of gene expression in the histidine transport operon of *Salmonella typhimurium*: Involvement of REP sequences. *Mol. Microbiol.* **2**:141-152.
- Streulens, M.J., Carlier, E., Maes, N., Serruys, E., Quint, W.G. and van Belkum, A.** (1993) – Nosocomial colonization and infection with multi-resistant *Acinetobacter baumannii*: outbreak delineation using DNA macrorestriction analysis and PCR-fingerprinting. *J. Hosp. Infect.* **25**: 15-32.
- Svedhem, A. and Kaijser, B.** (1980) – *Campylobacter fetus* subspecies *jejuni*: a common cause of diarrhoea in Sweden. *J. Infect. Dis.* **142**: 353-359.
- Tanner, A.C.R., Badger, S., Lai, C.-H., Lisgarten, M.A., Visconti, R.A. and Socransky, S.S.** (1981) – *Wolinella* gen., nov., *Wolinella succinogenes* (*Vibrio succinogenes* Wolin et al.) comb. nov., and description of *Bacterioides gracilis* sp. nov., *Wolinella recta* sp. nov., *Campylobacter concisus* sp. nov., and *Eikenella corodens* from humans with periodontal disease. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **31**: 432-445.
- Taylor, D.E.** (1984) - Plasmids from *Campylobacter*. In: *Campylobacter infections in man and animals*, p. 87-96. J.P. Butzler ed., CRC Press Inc., Boca-Raton, Fla.
- Taylor D.E. and Courvalin, P.** (1988) - Mechanisms of antibiotic resistance in *Campylobacter* species, *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**:1107-1112.
- Taylor, D.E., Chang, N., Garner, R.S., Sherburne, R., and Mueller, L.** (1986) - Incidence of antibiotic resistance and characterization of plasmids in *Campylobacter jejuni* strains isolated from clinical sources in Alberta, Canada. *Can. J. Microbiol.* **32**: 28-32.
- Taylor, D.E., Eaton, M., Yan, W. and Chang, N.** (1992) – Genome maps of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J. Bacteriol.* **174**: 2332-2337.
- Taylor, D.E., Ng, L.K., and Lior, H.** (1985) - Susceptibility of *Campylobacter* species to nalidixic acid, enoxacin and other DNA gyrase inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **28**: 708-710.
- Taylor, D.N.** (1992) – *Campylobacter* infection in developing countries. In: *Campylobacter jejuni – Current status and future trends* pp 20 –30. Irving Nachamkin, M.J. Blaser and Lucy S. Tompkins eds. American Society for Microbiology. Washington. D.C.
- Taylor, D.E. and Hiratsuka, K.** (1990) Use of non-radioactive DNA probes for detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in stool specimens. *Mol. Cell Probes* **4**: 261–271.
- Taylor, D.N., Blaser, M.J., Echeverria, P., Pitarangsi, C., Bodhidatta, L., and Wang, W.L.** (1987) - Erythromycin-resistant *Campylobacter* infections in Thailand. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**: 438-442.
- Taylor, D.N., McDermott, K.T., Little, J.R., Well, J.G. and Blaser, M.J.** (1983). *Campylobacter* enteritis from untreated water in Rocky Mountains. *Ann. Intern. Med.* **99**: 38-40.

- Taylor, D.N., Porter, B.W., Williams, C.A., Miller, H.G., Bopp, C.A. and Blake, P.A.** (1982) - *Campylobacter* enteritis: a large outbreak traced to commercial raw milk, *West. J. Med.* **137**: 365-369.
- Taylor, P.R., Weinstein, W.M and Bryner, J.H.** (1979) – *Campylobacter fetus* infection in human subjects: association with raw milk. *Am. J. Med.* **66**: 779 – 783.
- Tee, W., Anderson, B.N., Ross, B.C., and Dwyer, B.** (1987) – Atypical *Campylobacters* associated with gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.* **25**: 1248-1252.
- Tee, W., Baird, R., Dyall-Smith, M. and Dwyer, B.** (1988) – *Campylobacter cryaerophila* isolated from a human. *J. Clin. Microbiol.* **26**: 2469-2473.
- Theobald Smith, M.D. and Taylor, M.S.** (1919) – Some morphological and biological characters of *Spirilla* (*Vibrio fetus*, n. sp.) associated with disease of the fetal membranes in cattle. *J. Exp. Med.*, **30**: 299-311.
- Thomashow, L.S. and Rittenberg, S.C.** (1985) – Waveform analysis and structure of flagella and basal complexes from *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J. *J. Bacteriol.* **163**: 1038-1046.
- Thompson L.M. III, Smibert, R.M., Johnson. J.L. and Krieg, N.R.** (1988) – Phylogenetic study of the genus *Campylobacter*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**: 190-200.
- Torre, E., and Tello, M.** (1993) – Factors influencing faecal shedding of *Campylobacter jejuni* in dogs with diarrhoea. *Am. J. Vet. Res.* **54**: 260 – 262.
- Totten, P.A., Fennell, C.L., Tenover, F.C., Wezenberg, J.M., Perine, P.L., Stamm, W.E. and Holmes, K.K.** (1985) - *Campylobacter cinaedi* (sp. nov.) and *Campylobacter fennelliae* (sp. nov.): two new *Campylobacter* species associated with enteric disease in homosexual men. *J. Infect. Dis.* **151**: 131-139.
- Totten, P.A., Patton, C.M., Tenover, F.C., Barrett, T.J., Stamm, W.E., Steigerwalt, A.G., Lin, J.Y., Holmes, K.K. and Brenner, D.J.** (1987) – Prevalence and characterization of hippurate-negative *Campylobacter jejuni* in King County, Washington. *J. Clin. Microbiol.* **25**: 1747-1752.
- Touvenot, H., and Florent, A.** (1954) – Étude d'un anaérobie du sperme du taureau et du vagin de la vache *Vibrio bubulus* Florent 1953. *Ann. Inst. Pasteur*, **86** : 237-241.
- Trachtenberg, S., and DeRosier, D.J.** (1988) – Three-dimensional reconstruction of the flagellar filament of *Caulobacter crescentus*. A flagellin lacking the outer domain and its amino acid sequence lacking and internal segment. *J. Mol Biol.* **202**: 787-808.
- Tu, Z.-C., Eisner, W., Kreiswirth, B.N., and Blaser, M.J.** (2005) – Genetic divergence of *Campylobacter fetus* strains of mammal and reptile origins. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 3334-3340.
- Turner, P.C., McLennan, A.G., Bates, A.D. and White, M.R.H.** (2000) – *Molecular Biology*, 2^a Ed. B.D. Hames. London.
- Ursing, J., Sandstedt, K. and Hansson, E.** (1984) – Genetic and phenotypic characteristics of a new group of *Campylobacter* isolated from pigs and cattle. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. [B]*. **92**: 71-72.
- Ursing, J., Walder, M. and Sandstedt, K.** (1983) - Base composition and sequence homology of deoxyribonucleic acid of thermotolerant *Campylobacter* from human and animals sources. *Curr. Microbiol.* **8**: 307-310.
- Uyttendaele, M., Schukkink, R., van Gemen, B. and Debevere, J.** (1994) – Identification of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter lari* by the nucleic acid amplification system NASBAR. *J. Appl. Bacteriol.* **77**: 694-701.
- Valério, E., Pereira, P., Saker, M. L., Franca, S., and Tenreiro, R.** (2005) – Molecular characterization of *Cylindrospermopsis raciborskii* strains isolated from Portuguese freshwaters. *Harmful Algae* **4**: 1044-1052.
- van Belkum, A., Streulens, M. and Quint, W.** (1993) – Typing of *Legionella pneumophila* strains by polymerase chain reaction-mediated DNA fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 2198-2200.
- van Bergen, M.A.P., Dingle, K.E., Maiden, M.C.J., Newell, D.G., van der Graaf-Van Blois, L., van Putten, J.P.M. and Wagenaar, J.A.** (2005) - Clonal nature of *Campylobacter fetus* as defined by multilocus sequence typing. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 5888-5898.
- Van Doorn L.J., Giesendorf, B.A., Bax, R., van der Zeijst, B. A., Vandamme, P. and Quint, W.G.** (1997) – Molecular discrimination between *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari* and *Campylobacter upsaliensis* by polymerase chain reaction based on a novel putative GTPase gene. *Mol. Cell. Probes.* **11**: 177-185.

- Van Doorn L.-J., Verschuuren-van Haperen, A., van Belkum, A., Endtz, H.P., Vliegthart, J.S., Vandamme, P. and Quint, W.G.V.** (1998) – Rapid identification of diverse *Campylobacter lari* strains isolated from mussels and oysters using a reverse hybridization line probe assay. *J. Appl. Microbiol.* **84**: 545-550.
- Van de Giessen, A.W., Tilburg, J. J. H. C., Ritmeester, W. S. and Van der Plas, J.** (1998) - Reduction of campylobacter infections in broiler flocks by application of hygiene measures. *Epidemiol. Infect.* **121**: 57-66
- Vandamme, P.** (2000) - Taxonomy of the family *Campylobacteriaceae*. In: *Campylobacter*, pp. 3-26. I. Nachamkin and M.J. Blaser eds. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Vandamme, P. and De Ley, J.** (1991) – Proposal for a new family, Campylobacteriaceae. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**: 451-455.
- Vandamme, P. and On, S.L.W.,** (2001) – Recommendations of Subcommittee on the taxonomy of *Campylobacter* and related bacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 719-721.
- Vandamme, P., Dewhirst, F.E., Paster, B.J. and On, S.L.W.** (2005). Family I. Campylobacteraceae. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 2nd ed (G. M. Garrity, Ed.) Volume 2: The Proteobacteria, Part C: The Alpha-, Beta-, Delta- and Epsilon-proteobacteria. D.J. Brenner, N.R. Krieg and J.T. Staley, eds. pp. 1145-1160. Springer: New York.
- Vandamme, P., Falsen, E., Pot, B., Hoste, B., Kersters, K. and De Ley, J.** (1989) – Identification of EF group 22 campylobacters from gastroenteritis cases as *Campylobacter concisus*. *J. Clin. Microbiol.* **27**: 1775-1781.
- Vandamme, P., Falsen, E., Rossau, R., Hoste, B., Segers, P., Tytgat, R. and De Ley, J.** (1991) – Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of genetics descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**: 88-103.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K., and Swings, S.** (1996) – Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* **60**: 407-438.
- Vandamme, P., Vancanneyt, M., Pot, B., Mels, L., Hoste, B., Dewettinck, D., Vlaes, L., van den Borre, C., Higgins, R., Hommez, J., Kersters, K., Butzler, J.P. and Goossens, H.** (1992) – Polyphasic taxonomic study of emended genus *Arcobacter* with *Arcobacter butzleri* comb. nov. and *Arcobacter skirrowii* sp. nov., an aerotolerant bacterium isolated from veterinary specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**: 344-356.
- Velásquez, J.B., Jiménez, A., Chomón, B. and Villa, T.G.** (1995) - Incidence and transmission of antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* **35**:173-178.
- Véron, M. and Chatelain, R.** (1973) – Taxonomic study of the genus *Campylobacter* Sebald and Véron and designation of neotype strain for the type species, *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor) Sebald and Véron. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **23**: 122-134.
- Versalovic, J., Koeuth, T. and Lupski, J.R.** (1991) – Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acid Res.* **19**: 6823-6831.
- Versalovic, J., Koeuth, T., Zhang, Y.M., McCabe, E.R.B. and Lupski, J.R.** (1992) – Quality control for bacterial inhibition assays: DNA fingerprinting of microorganisms by Rep-PCR. *Screening* **1**:175-183.
- Vila, J., Marcos, M.A. and Jimenez de Anta, M.T.** (1996) – A comparative study of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for typing of the *Acinetobacter caucoaceticus*-*A. baumannii* complex. *J. Med. Microbiol.* **44** :482-489.
- Vinzent, R., Dumas, J. and Picard, N.** (1947) – Septicémie grave au cours de la grossesse due à un vibron : avortement consécutif. *Bull. Acad. Med. Natl Med.* **131**: 90-93.
- Vogt, R.L., Sours, H.E., Barret, T., Feldman, R.A., Dickson, A. and Witnerell, L.** (1982) - *Campylobacter* enteritis associated with water contaminated. *Ann. Intern. Med.* **96**: 292-296.
- Von Graevenitz, A.** (1990) - Revised nomenclature of *Campylobacter lari*, *Enterobacter intermedium*, and "Flavobacterium branchiophila." *Int. J. Syst. Bacteriol.* **40**:211.
- Vonderviszt, F., Aizawa, S., and Namba, K.** (1991) – Role of the disordered terminal regions of flagellin in filament formation and stability. *J. Mol. Biol.* **221**: 1461-1474.
- Vonderviszt, F., Kanto, S., Aizawa, S., and Namba, K.** (1989) – Terminal regions of flagellin are disordered in solution. *J. Mol. Biol.* **209**: 127-133.

Vos, P., Hogers, R., Blecker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. (1995) – AFLP: a new concept for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* **23**: 4407-4414.

Waegel, A. and Nachamkin, I. (1996) – Detection and molecular typing of *Campylobacter jejuni* in fecal samples by polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Probes* **10**: 75-80.

Walder, M. (1982) – Epidemiology of *Campylobacter* enteritis. *Scand. J. Infect. Dis.* **14**: 27-33.

Walker, R. I., Caldwell, M.B., Lee, E.C., Guerry, P., Trust, T.J. and Ruiz-Palacios, G. M. (1986) - Pathophysiology of *Campylobacter* enteritis. *Microbiol. Rev.* **50**: 81-94.

Wang, G., Clark C., G., Taylor, T. M., Pucknell, C., Barton, C. Price, L., Woodward, D. L., and Rodgers, F. G. (2002) – Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *fetus*. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 4744-4747.

Wang, W.L., Reller, L.B. and Blaser, M.J. (1984) - Comparison of antimicrobial susceptibility patterns of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **26**: 351-353.

Wang, W.L., Luechtefeld, N.W., Blaser, M.J. and Reller, L.B. (1982) – Comparison of Campy Pak II with standard 5 % oxygen and candle jar growth of *Campylobacter jejuni* from human faeces. *J. Clin. Microbiol.* **16**: 291-294.

Wang, Y., Huang, W.M. and Taylor, D.E. (1993) - Cloning and nucleotide sequence of the *Campylobacter jejuni* gyrA gene and characterization of quinolonone resistance mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**: 457-463.

Wassenaar, T.M. and Newell, D.G. (2000) – Genotyping of *Campylobacter* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1-9.

Wassenaar, T.M., Geilhausen, B. and Newell, D.G. (1998) – Evidence of genomic instability of *Campylobacter* isolated from poultry. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1816-1821.

Wassenaar, T.M., Newel, D.G., and van der Zeijst, B.A.M. (1993) – Intermolecular and intramolecular recombination between flagellin genes of *Campylobacter jejuni*. *Act Gastro- Enterologica Belgica*. **56** (suppl.): 16.

Watts JL (Committee Chair). National Committee for Clinical Laboratory Standards (1999) Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard. **19** (No 11) M31-A.

Weijtens, M.J., Beijker, P.J., van der Plas, J., Urlings, H.A. and Biesheuvel, M.H. (1993) – Prevalence of *Campylobacter* in pigs during fattening; an epidemiological study. *Vet Q.* **15**: 138-143.

Welch, D.F. (1995) – Microbial identification by GLC. *Clin. Microbiol. Newslett.* **17**: 105-108.

Welsh, J. and Mc McClelland, M. (1990) – Fingerprinting genome using PCR with arbitrary primers; *Nucleic Acids Res.* **18**: 7213- 7218.

Wenman, W.M., Chai, J., Louie, T.J., Goudreau, C., Lior, H., Newell, D.G., Pearson, A.D. and Taylor, D.E. (1985a) – Antigenic analysis of *Campylobacter* flagellar protein and other proteins. *J. Clin. Microbiol.* **21**: 108-112.

Wenman, W. M., Taylor, D. E., and Lior H. (1985b) – The flagellar protein determines *Campylobacter jejuni* heat-labile serotype. In: *Campylobacter* III, pp. 212. A.D. Pearson, M.B., Skirrow, B. Lior, H., and Rowe, J. R. eds. Proceeding of the second International Workshop on *Campylobacter* infections. Public Health Laboratory Service, London.

Whelan, C.D., Monaghan, P., Girdwood, R.W. and Fricker, C.R. (1988) – The significance of wild birds (*Larus* sp.) in the epidemiology of *Campylobacter* infections in human. *Epidemiol. Infect.* **101**: 259-267.

William, J.G., Kubelick, A.R., Livak, K.J. Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. (1990). – DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* **18**: 6531-6535.

Wittwer, M., Keller, J., Wassenaar, T.M., Stephan, R., Howald, D., Regula, G. and Bissig-Choisat, B. (2005). Genetic diversity and antibiotic resistance patterns in a *Campylobacter* population isolated from poultry farms in Switzerland. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:2840-2847.

Woese, C.R. (1987) – Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**: 221-271.

- Woods, Jr, C.R., Versalovic, J., Koeuth, T. and Lupski, J.R.** (1992) – Analysis of relationships among isolates of *Citrobacter diversus* by using DNA fingerprints generated by repetitive sequence-based primers in the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 2921-2929.
- Woods, C.R., Versalovic, J., Koeuth, T. and Lupski, J.R.** (1993) – Whole cell repetitive element sequence-based polymerase chain reaction allows rapid assessment of clonal relationships of bacterial isolates. *J. Clin. Microbiol.* **31**:1927-1931.
- Wroe, S. J. and Blumhardt, L. D.** (1985) – Acute polyneuritis with cranial nerve involvement following *Campylobacter jejuni* infection. *J. Neurol. Neurosurg Psychiatry.* **48**: 593.
- Yan, W., Chang, N. and Taylor, D.E.** (1991) – Pulsed field gel electrophoresis of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* genomic DNA and its epidemiologic application. *J. Infect. Dis.* **163**: 1068-1072.
- Zar, J.H.** (1999) – *Biostatistical analysis*. 4th ed. Prentice-Hall: London.
- Zirnstein, G., Helsel, L., Li, Y., Swaminathan, B., and Besser, J.** (2000) – Characterization of *gyrA* mutation associated with fluoroquinolone resistance in *Campylobacter coli* by DNA sequence analysis and MAMA PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* **190**: 1-7.
- Zirnstein, G., Li, Y., Swaminathan, B., and Angulo, F.** (1999) – Ciprofloxacin resistance in *Campylobacter jejuni* isolates: detection of *gyrA* resistance mutations by mismatch amplification mutation assay PCR and DNA sequence analysis, *J. Clin. Microbiol.* **37**: 3276-3280.
- Zorman, T., Heyndrickx, M., Uzunovic-Kamberovic, S. and Smole Mozina S.** (2006) - Genotyping of *Campylobacter coli* and *C. jejuni* from retail chicken meat and humans with camoylobacteriosis in Slovenia and Bosnia and Herzegovina. *Int. J. Food Microbiol.* **110**: 24-33.